

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2004 年 10 月 28 日 (28.10.2004)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2004/091663 A1(51) 国際特許分類: A61K 45/00, 31/404,  
31/4045, 31/407, 31/553, C07D 403/04, 403/14, 498/22,  
A61P 25/28, 25/08, 25/22, 25/18, 25/24, C07D 487/14

(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/005503

(22) 国際出願日: 2004 年 4 月 16 日 (16.04.2004)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2003-114579 2003 年 4 月 18 日 (18.04.2003) JP(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 協和醗酵  
工業株式会社 (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.)  
[JP/JP]; 〒1008185 東京都千代田区大手町一丁目 6 番  
1 号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 森下 剛  
(MORISHITA, Tsuyoshi). 桜田 一洋 (SAKURADA,  
Kazuhiro). 鈴木 恵子 (SUZUKI, Keiko). 池田 俊一  
(IKEDA, Shun-ichi).(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が  
可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,  
BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,  
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,  
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,  
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA,  
NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE,  
SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,  
UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が  
可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL,  
SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG,  
KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY,  
CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC,  
NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG,  
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: DRUG FOR NERVE REGENERATION

(54) 発明の名称: 神経再生薬

(57) Abstract: It is intended to provide a drug for nerve degeneration, a nerve stem cell neurogenesis promoter, a neuron obtained by culturing a nerve stem cell in the presence of the neurogenesis promoter, and a method of producing the neuron. To achieve the above objects, a drug for nerve degeneration which contains as the active ingredient a substance inhibiting the activity of a glycogen synthase kinase-3, a nerve stem cell neurogenesis promoter containing this substance as the active ingredient, a neuron obtained by culturing a nerve stem cell in the presence of the neurogenesis promoter, and a method of producing the neuron are provided. The above-described drugs are useful as remedies for nerve diseases such as Parkinson's disease, Alzheimer's disease, Down's disease, cerebrovascular disorder, cerebral stroke, spinal injury, Huntington's chorea, multiple sclerosis, amyotrophic lateral sclerosis, epilepsy, anxiety disorder, integration dysfunction syndrome, depression and manic-depressive.

(57) 要約: 本発明の課題は、神経再生薬、神経幹細胞のニューロン新生促進剤、該ニューロン新生促進剤の存在下、神経幹細胞を培養して得られるニューロンおよび該ニューロンの製造方法を提供することにある。該課題を解決するために、本発明は、グリコーゲンシンターゼキナーゼ-3 の活性を阻害する物質を有効成分として含有する神経再生薬、該物質を有効成分として含有する神経幹細胞のニューロン新生促進剤、該ニューロン新生促進剤の存在下、神経幹細胞を培養して得られるニューロンおよび該ニューロンの製造方法を提供する。本発明の医薬は、パーキンソン病、アルツハイマー病、ダウン症、脳血管障害、脳卒中、脊髄損傷、ハンチントン舞踏病、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症、てんかん、不安障害、統合失調症、うつ病、躁鬱病などの神経疾患治療薬として有用である。

WO 2004/091663 A1

## 明細書

## 神経再生薬

## 技術分野

本発明はグリコーゲンシンターゼキナーゼ-3（以下、GSK-3と略す）の活性を阻害する物質を有効成分として含有してなる神経再生薬、GSK-3の活性を阻害する物質を有効成分として含有してなるニューロン新生促進剤、該ニューロン新生促進剤の存在下、神経幹細胞を培養して得られるニューロン、および該ニューロンの製造方法に関する。

## 10 背景技術

神経疾患とは、脳や末梢のニューロンが遺伝的要因、環境要因、加齢要因などにより傷害を受ける疾患である神経変性疾患と、神経の変性を伴わないうつ病および躁鬱病等とを総称する。神経変性疾患として、具体的には、パーキンソン病、アルツハイマー病、ポリグルタミン酸病、筋萎縮性側索硬化症、多発ニューロパチー、  
15 脊髄損傷、脳血管障害などがあげられる。これら神経変性疾患の一般的治療法は、ニューロンの傷害により失われた神経伝達物質を補充する療法であるが、該療法で症状が改善するのはパーキンソン病、アルツハイマー病などに限定される。また神経伝達物質補充療法では神経細胞死の進行を止めることはできない。

中枢神経系を再生する再生医療は、パーキンソン病で失われたドーパミン作動性ニューロンの機能を積極的に回復させる治療法として検討が進められてきたが、中絶胎児脳を用いる方法であることから様々な問題があり一般的な利用としては応用されていない。

また、胎児脳から取得した神経幹細胞やヒト受精卵から取得したES細胞を生体外で大量培養した後、目的のニューロンへ変換して移植に用いるという治療法も検討されているが、目的とするニューロンへ正確に分化させる技術は確立されておらず、また胎児由来の神経幹細胞やヒトES細胞を用いる方法であることに起因する問題もあり、臨床応用は進んでいない。

一方、成体脳から神経幹細胞が分離され、ヒト成体脳でも生涯にわたりニューロンの新生が起こることが報告されたことから、患者の脳内に内在する神経幹細胞を

薬剤などで刺激して再生を誘導して神経変性疾患を治療する方法が検討されている。

インスリン様増殖因子-1 [J. Neuroscience, 20, 2896-2903(2000)]、線維芽細胞増殖因子-2 [Pro. Nat. Acad. Sci. USA, 98, 5874-5879(2001)]、ステムセルファクター [J. Clin. Invest., 110, 311-319(2002)]、エリスロポエチン [J. Neuroscience, 21, 9733-9743(2001)]、全脳虚血 [J. Neuroscience, 18, 7768-7778(1998)]、てんかん刺激 [J. Neuroscience, 22, 3174-3188(2002)] などサイトカインの脳内投与や疾患モデルにより海馬や嗅球でのニューロン新生が促進されることが報告されている。また、腫瘍増殖因子- $\alpha$ の脳内投与により線条体  
10 でドーパミン作動性ニューロンが新生し、パーキンソン病の症状が改善することも報告されている [Pro. Nat. Acad. Sci. USA, 97, 14686-14691(2000)]。さらに、海馬への虚血傷害により失われたCA1錐体細胞が虚血後2日目から5日目にかけて脳内に線維芽細胞増殖因子-2と上皮細胞増殖因子を投与することにより、その40%が完全に回復することも報告されている [Cell, 110, 429-441(2002)]。  
15 しかし、上記の方法は、いずれも蛋白性の因子を脳内に投与することが必要であり、一般的な医療へと応用することは困難である。

末梢投与可能な低分子化合物によりニューロン新生を惹起できるものとしては、モノアミンオキシダーゼ阻害剤、セロトニン特異的なトランスポーター阻害剤、フォスフォジエステラーゼ IV 阻害剤などの抗鬱薬が報告されている  
20 [Neuropsychopharmacology, 25, 836-844(2001)]。これらの薬剤が脳内で神経再生を誘導するメカニズムとしては、セロトニン作動性ニューロンのセロトニン受容体シグナルに直接的または間接的に作用して、神経栄養因子を生産し、セロトニン作動性ニューロン周囲のニューロン新生を促進していることが考えられている。したがって、これらの薬剤はセロトニン作動性ニューロンの変性とは関係しない大部分の神経疾患においては、神経再生薬として利用することはできないと考えられる。  
25

また、気分安定化薬のリチウムが細胞死抑制遺伝子 bcl-2 の発現を誘導することにより海馬で恒常的に新生している新生ニューロンをニューロン死から保護し、海馬でのニューロン新生を見かけ上増加させることが報告されている [J. Neurochemistry, 75, 1729-1734(2000)]。またリチウムは神経栄養因子 BDNF の発

現を誘導することも報告されている [Neuropharmacology, 43, 1173-1179 (2002)]。しかしながら、リチウムが直接、神経幹細胞に働きかけ、ニューロン分化を促進することによりニューロン新生を促進させることについては報告されておらず、またリチウムの海馬以外でのニューロン新生促進活性についても報告されていない。また、リチウムが何故、神経変性を伴わないうつ病および躁鬱病に対し治療効果があるのかについても知られていない。

アルツハイマー病では、グリコーゲンシンターゼキナーゼ-3 (以下、GSK-3 と略す) が、微小管関連蛋白質であるタウ蛋白質を過剰にリン酸化することで神経原繊維変化を形成し、神経細胞死を誘導するという仮説が提唱されている [Trends in Molecular Medicine, 8, 126-132 (2002)]。また GSK-3 の活性を阻害する物質は、in vitro において成熟した神経細胞を保護する活性があると報告されている [J. Neurochemistry, 77, 94-102 (2001)]。該報告に基づき、GSK-3 の活性を阻害する物質は、アルツハイマー病をはじめ様々な神経変性疾患の治療薬として用いることができると考えられている (国際公開第 00/38675 号パンフレット) が、成熟したニューロンを保護することで実際に神経変性疾患を治療することができるか否か、および GSK-3 の活性を阻害する物質にニューロン新生促進作用があることは知られていない。

#### 発明の開示

本発明の目的は、GSK-3 の活性を阻害する物質を有効成分として含有してなる神経再生薬、該物質を有効成分として含有してなる神経幹細胞のニューロン新生促進剤、該ニューロン新生促進剤の存在下、神経幹細胞を培養して得られるニューロンおよび該ニューロンの製造方法を提供することにある。

本発明は以下の (1) ~ (41) に関する。

(1) グリコーゲンシンターゼキナーゼ-3 (以下、GSK-3 と略す) の活性を阻害する物質を有効成分として含有してなる神経再生薬。

(2) 神経再生薬が、神経疾患の治療薬である上記 (1) の医薬。

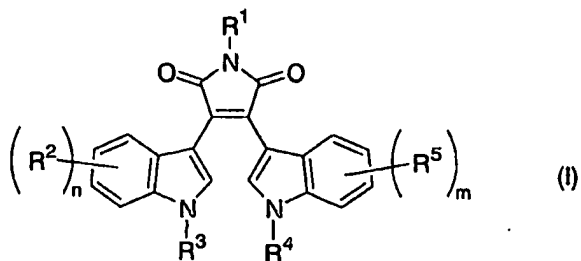
(3) 神経疾患が、パーキンソン病、アルツハイマー病、ダウン症、脳血管障

害、脳卒中、脊髄損傷、ハンチントン舞踏病、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症、てんかん、不安障害、統合失調症、うつ病および躁鬱病からなる群より選ばれる神経疾患である上記（２）の医薬。

（４） GSK-3の活性を阻害する物質が、リチウムまたはその薬理学的に許容される塩である上記（１）～（３）のいずれか１つの医薬。

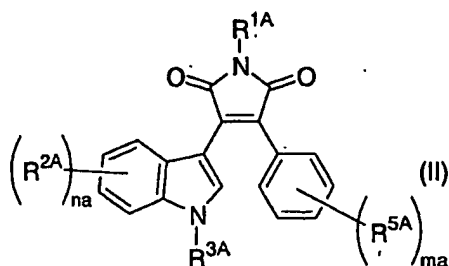
（５） GSK-3の活性を阻害する物質が、ビスインドリルマレイミド誘導体、３-アリール-４-インドリルマレイミド誘導体、インドロカルバゾール誘導体、インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン誘導体もしくはインジルピン誘導体またはそれらの薬理学的に許容される塩である上記（１）～（３）のいずれか１つの医薬。

（６） GSK-3の活性を阻害する物質が、式(I)

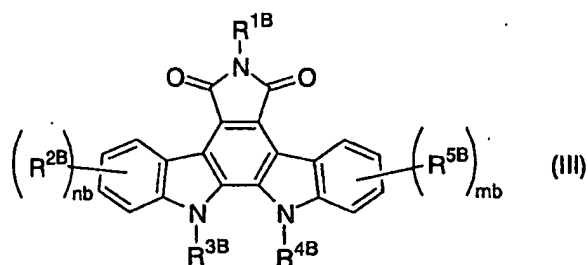


〔式中、 $n$  および  $m$  は同一または異なって、1～3の整数を表し、 $R^1$ 、 $R^3$  および  $R^4$  は同一または異なって、水素原子、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換の低級アルケニル、 $-COR^6$ （式中、 $R^6$  は水素原子、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換の低級アルケニル、置換もしくは非置換のアリールまたは置換もしくは非置換のシクロアルキルを表す）、 $-COOR^7$ （式中、 $R^7$  は水素原子、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換のアリールまたは置換もしくは非置換のシクロアルキルを表す）または $-OR^8$ （式中、 $R^8$  は水素原子、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換のアリールまたは置換もしくは非置換のシクロアルキルを表す）を表し、 $R^2$  および  $R^5$  は同一または異なって、水素原子、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換の低級アルケニル、置換もしくは非置換の低級アルコキシ、置換もしくは非置換の低級アルコキシカルボニル、置換もしくは非置換のアリール、カルボキシ、ハロゲン、ヒドロキシ、ニトロ、アミノまたはモノもしくはジ低級アルキルアミノを表し、 $n$  および  $m$

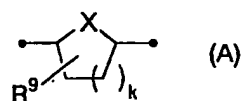
がそれぞれ 2 または 3 であるとき、それぞれの  $R^2$  および  $R^5$  は同一でも異なっているてもよい] で表される化合物、式(II)



(式中、na、ma、 $R^{1A}$ 、 $R^{2A}$ 、 $R^{3A}$  および  $R^{5A}$  は、それぞれ前記 n、m、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$  および  $R^5$  と同義である) で表される化合物もしくは式(III)

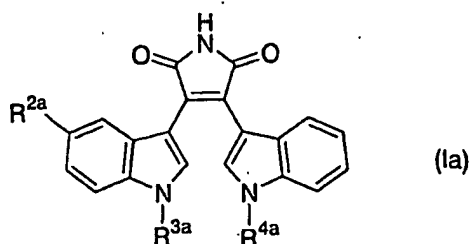


[式中、nb、mb、 $R^{1B}$ 、 $R^{2B}$  および  $R^{5B}$  は、それぞれ前記 n、m、 $R^1$ 、 $R^2$  および  $R^5$  と同義であり、 $R^{3B}$  および  $R^{4B}$  は同一または異なって、水素原子、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換の低級アルケニル、 $-COR^6$  (式中、 $R^6$  は前記と同義である)、 $-COOR^7$  (式中、 $R^7$  は前記と同義である) または  $-OR^8$  (式中、 $R^8$  は前記と同義である) を表すか、または  $R^{3B}$  と  $R^{4B}$  が一緒になって、



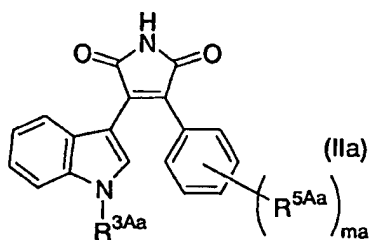
(式中、k は 1 または 2 を表し、X は  $CH_2$ 、NH、酸素原子または硫黄原子を表し、 $R^9$  はヒドロキシ、カルボキシ、カルバモイルまたは低級アルコキシカルボニルを表す) を形成する] で表される化合物またはそれらの薬理学的に許容される塩である上記 (1) ~ (3) のいずれか 1 つの医薬。

(7) GSK-3 の活性を阻害する物質が、式(1a)



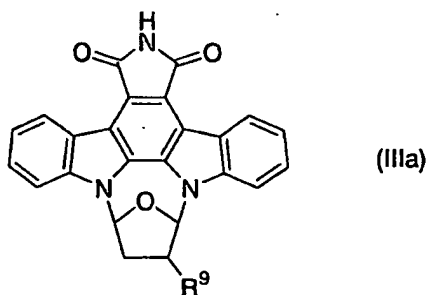
(式中、 $R^{2a}$  は水素原子、低級アルコキシ、低級アルコキシカルボニル、アリールまたはニトロを表し、 $R^{3a}$  および  $R^{4a}$  は同一または異なって、置換もしくは非置換の低級アルキルを表す) で表される化合物またはその薬理学的に許容される塩である上記 (1) ~ (3) のいずれか 1 つの医薬。

(8) GSK-3 の活性を阻害する物質が、式 (IIa)



(式中、 $ma$  は前記と同義であり、 $R^{3Aa}$  は置換もしくは非置換の低級アルキルを表し、 $R^{5Aa}$  はハロゲンを表す) で表される化合物またはその薬理学的に許容される塩である上記 (1) ~ (3) のいずれか 1 つの医薬。

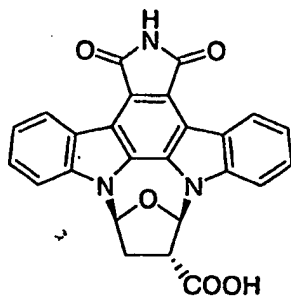
(9) GSK-3 の活性を阻害する物質が、式 (IIIa)



(式中、 $R^9$  は前記と同義である) で表される化合物またはその薬理学的に許容される塩である上記 (1) ~ (3) のいずれか 1 つの医薬。

(10) GSK-3 の活性を阻害する物質が、3, 4-ビス (1-メチルインドール-3-イル) -1H-ピロール-2, 5-ジオン、3- (1-メチルインドール-3-イル) -4- (1-プロピルインドール-3-イル) -1H-ピロール-2, 5-ジオン、3- [1- (3-シアノプロピル) インドール-3-イル] -4- (1-メチルインドール-3-イル) -1H-ピロール-2, 5-ジオン、3

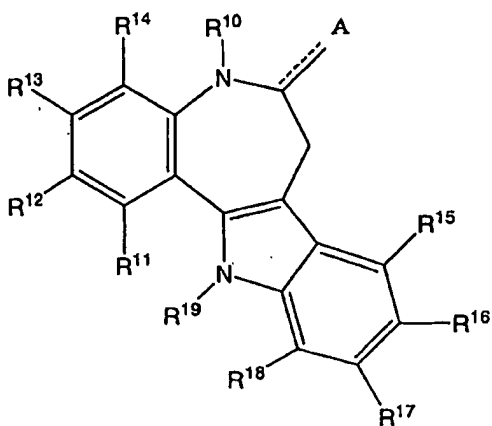
- [1 - (3 - アミノプロピル) インドール - 3 - イル] - 4 - (1 - メチルインドール - 3 - イル) - 1H-ピロール - 2, 5-ジオン、3 - [1 - (3 - カルボキシプロピル) インドール - 3 - イル] - 4 - (1 - メチルインドール - 3 - イル) - 1H-ピロール - 2, 5-ジオン、3 - [1 - (3 - カルバモイルプロピル) インドール - 3 - イル] - 4 - (1 - メチルインドール - 3 - イル) - 1H-ピロール - 2, 5-ジオン、3 - [1 - (3 - アミノプロピル) インドール - 3 - イル] - 4 - (1 - メチル - 5 - プロピルオキシインドール - 3 - イル) - 1H-ピロール - 2, 5-ジオン、3 - [1 - (3 - ヒドロキシプロピル) インドール - 3 - イル] - 4 - (1 - メチル - 5 - フェニルインドール - 3 - イル) - 1H-ピロール - 2, 5-ジオン、3 - [1 - (3 - アミノプロピル) インドール - 3 - イル] - 4 - (1 - メチル - 5 - フェニルインドール - 3 - イル) - 1H-ピロール - 2, 5-ジオン、3 - [1 - (3 - ヒドロキシプロピル) インドール - 3 - イル] - 4 - (1 - メチル - 5 - メトキシカルボニルインドール - 3 - イル) - 1H-ピロール - 2, 5-ジオン、3 - [1 - (3 - ヒドロキシプロピル) インドール - 3 - イル] - 4 - (1 - メチル - 5 - ニトロインドール - 3 - イル) - 1H-ピロール - 2, 5-ジオン、3 - (1 - メチルインドール - 3 - イル) - 4 - [1 - (3 - ヒドロキシプロピル) - 5 - ニトロインドール - 3 - イル] - 1H-ピロール - 2, 5-ジオン、3 - (2 - クロロフェニル) - 4 - (1 - メチルインドール - 3 - イル) - 1H-ピロール - 2, 5-ジオン、3 - (2, 4 - ジクロロフェニル) - 4 - (1 - メチルインドール - 3 - イル) - 1H-ピロール - 2, 5-ジオン、3 - (2 - クロロフェニル) - 4 - [1 - (3 - ヒドロキシプロピル) インドール - 3 - イル] - 1H-ピロール - 2, 5-ジオン、4 - [1 - (3 - アミノプロピル) インドール - 3 - イル] - 3 - (2 - クロロフェニル) - 1H-ピロール - 2, 5-ジオンおよび





からなる群より選ばれる化合物またはその薬理学的に許容される塩である上記  
(1) ~ (3) のいずれか1つの医薬。

(11) GSK-3を阻害する物質が、式(IV)



(IV)

- 5 [式中、Aは単結合または二重結合によって右に結合されている酸素または硫黄であり、R<sup>10</sup>は水素原子、アリール、低級脂肪族置換基、特にアルキルおよび低級アルキルエステルからなる群より選択され、R<sup>11</sup>~R<sup>14</sup>はアルコキシ、アミノ、アシル、脂肪族置換基、特にアルキル、アルケニルおよびアルキニル置換基、脂肪族アルコール、特にアルキルアルコール、脂肪族ニトリル、特にアルキルニトリル、シアノ、
- 10 ニトロ、カルボキシル、ハロゲン、水素原子、ヒドロキシル、イミノならびに  $\alpha$ 、 $\beta$  不飽和ケトンからなる群より個別に選択され、R<sup>15</sup>~R<sup>18</sup>は脂肪族置換基、特にアルキル、アルケニルおよびアルキニル置換基、特に低級脂肪族置換基、脂肪族アルコール、特にアルキルアルコール、アルコキシ、アシル、シアノ、ニトロ、エポキシ、ハロアルキル基、ハロゲン、水素原子ならびにヒドロキシルからなる群より個別に
- 15 別を選択され、R<sup>19</sup>は脂肪族の基、特に低級アルキル基、脂肪族アルコール、特にアルキルアルコール、カルボン酸、および水素からなる群より選択される] で表される化合物またはその薬理学的に許容される塩である上記(1) ~ (3) のいずれか1つの医薬。

- (12) GSK-3を阻害する物質が、7,12-ジヒドロ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、2-ブromo-7,12-ジヒドロ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、9-ブromo-7,12-ジヒドロ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、9-クロロ-7,12-ジヒドロ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、11-クロロ-7,12-ジヒドロ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン
- 20

- 6(5H)-オン、10-プロモ-7,12-ジヒドロ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン  
-6(5H)-オン、8-プロモ-6,11-ジヒドロ-チエノ[3',2':2,3アゼピノ[4,5-b]インド  
ール-5(4H)-オン、9-プロモ-7,12-ジヒドロ-4-メトキシ-インドロ[3,2-d][1]ベン  
ズアゼピン-6(5H)-オン、9-プロモ-7,12-ジヒドロ-4-ヒドロキシ-インドロ  
5 [3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、7,12-ジヒドロ-4-メトキシ-インドロ  
[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、9-プロモ-7,12-ジヒドロ-2,3-ジメトキシ  
-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、9-プロモ-7,12-ジヒドロ-2,3-  
ジヒドロキシ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、7,12-ジヒドロ  
-2,3-ジメトキシ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、7,12-ジヒドロ  
10 -9-トリフルオロメチル-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、7,12-ジ  
ヒドロ-2,3-ジメトキシ-9-トリフルオロメチル-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピ  
ン-6(5H)-オン、2-プロモ-7,12-ジヒドロ-9-トリフルオロメチル-インドロ  
[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、9-プロモ-7,12-ジヒドロ-インドロ  
[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-チオン、9-プロモ-5,12-ビス-(*t*-ブチルオキシ  
15 カルボニル)-7,12-ジヒドロ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、9-  
プロモ-12-(*t*-ブチルオキシカルボニル)-7,12-ジヒドロ-インドロ[3,2-d][1]ベン  
ズアゼピン-6(5H)-オン、9-プロモ-5,7-ビス-(*t*-ブチルオキシカルボニル)-7,12-  
ジヒドロ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、9-プロモ-5,7,12-トリ  
-(*t*-ブチルオキシカルボニル)-7,12-ジヒドロ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピ  
20 ン-6(5H)-オン、9-プロモ-7,12-ジヒドロ-5-メチルオキシカルボニルメチル-イン  
ドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、9-プロモ-7,12-ジヒドロ-12-メチル  
オキシカルボニルメチル-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、9-プロ  
モ-7,12-ジヒドロ-12-(2-ヒドロキシエチル)-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン  
-6(5H)-オン、2,9-ジプロモ-7,12-ジヒドロ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン  
25 -6(5H)-オン、8,10-ジクロロ-7,12-ジヒドロ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン  
-6(5H)-オン、9-シアノ-7,12-ジヒドロ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン  
-6(5H)-オン、9-プロモ-7,12-ジヒドロ-5-メチル-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼ  
ピン-6(5H)-オン、5-ペンジル-9-プロモ-7,12-ジヒドロ-5-メチル-インドロ  
[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、9-プロモ-7,12-ジヒドロ-12-メチル-イン

- ドロ[3, 2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、9-プロモ-12-エチル-7, 12-ジヒドロ-  
 インドロ[3, 2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、9-プロモ-7, 12-ジヒドロ-12-(2-  
 プロペニル)-インドロ[3, 2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、7, 12-ジヒドロ-9-  
 メチル-インドロ[3, 2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、7, 12-ジヒドロ-9-メトキ  
 5 シ-インドロ[3, 2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、9-フルオロ-7, 12-ジヒドロ  
 -12-(2-プロペニル)-インドロ[3, 2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、11-プロモ  
 -7, 12-ジヒドロ-インドロ[3, 2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、9-プロモ-7, 12-  
 ジヒドロ-2-(メチルイミノアミン)-インドロ[3, 2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オ  
 ン、9-プロモ-7, 12-ジヒドロ-2-(カルボン酸)-インドロ[3, 2-d][1]ベンズアゼピン  
 10 -6(5H)-オン、9-プロモ-7, 12-ジヒドロ-10-ヒドロキシ-インドロ[3, 2-d][1]ベンズ  
 アゼピン-6(5H)-オン、9-プロモ-7, 12-ジヒドロ-11-ヒドロキシメチル-インドロ  
 [3, 2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、7, 12-ジヒドロ-4-ヒドロキシ-インドロ  
 [3, 2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、7, 12-ジヒドロ-2, 3-ジヒドロキシ-インド  
 ロ[3, 2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、2, 3-ジメトキシ-9-ニトロ-7, 12-ジヒド  
 15 ロ-インドロ[3, 2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、9-シアノ-7, 12-ジヒドロ-イ  
 ンドロ[3, 2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、2, 3-ジメトキシ-9-シアノ-7, 12-ジ  
 ヒドロ-インドロ[3, 2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、9-ニトロ-7, 12-ジヒドロ  
 -インドロ[3, 2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、3-(6-オキソ-9-トリフルオロメ  
 チル-5, 6, 7, 12-テトラヒドロ-インドロ[3, 2-d][1]ベンズアゼピン-2-イル)プロピ  
 20 オニトリル、2-プロモ-9-ニトロ-7, 12-ジヒドロ-インドロ[3, 2-d][1]ベンズアゼピ  
 ン-6(5H)-オン、3-(6-オキソ-9-トリフルオロメチル-5, 6, 7, 12-テトラヒドロ-イン  
 ドロ[3, 2-d][1]ベンズアゼピン-2-イル)アクリロニトリル、2-(3-ヒドロキシ-1-プ  
 ロピニル)-9-トリフルオロメチル-7, 12-ジヒドロ-インドロ[3, 2-d][1]ベンズアゼ  
 ピン-6(5H)-オン、2-ヨード-9-プロモ-7, 12-ジヒドロ-インドロ[3, 2-d][1]ベンズ  
 25 アゼピン-6(5H)-オン、2-(3-オキソ-1-ブテニル)-9-トリフルオロメチル-7, 12-テ  
 トラヒドロ-インドロ[3, 2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、8-クロロ-6, 11-ジヒ  
 ドロ-チエノ[3', 2': 2, 3]アゼピノ[4, 5-b]インドール-5(4H)-オン、2-ヨード-9-ト  
 リフルオロメチル-7, 12-ジヒドロ-インドロ[3, 2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オ  
 ン、7, 12-ジヒドロ-ピリド[3', 2': 4, 5]ピロロ[3, 2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オ

ン、11-メチル-7,12-ジヒドロ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、  
 2-[2-(1-ヒドロキシシクロヘキシル)エチニル]-9-トリフルオロメチル-7,12-ジヒ  
 ドロ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、2-シアノ-7,12-ジヒドロ-  
 インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、2-ヨード-7,12-ジヒドロ-インド  
 5 ロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、11-エチル-7,12-ジヒドロ-インドロ  
 [3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、8-メチル-6,11-ジヒドロ-チエノ  
 [3',2':2,3]アゼピノ[4,5-b]インドール-5(4H)-オンおよび3-(6-オキソ-9-トリフ  
 ルオロメチル-5,6,7,12-テトラヒドロ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-2-イ  
 ル)アクリル酸メチルエステルからなる群より選ばれる化合物またはその薬理学的  
 10 に許容される塩である上記(1)～(3)のいずれか1つの医薬。

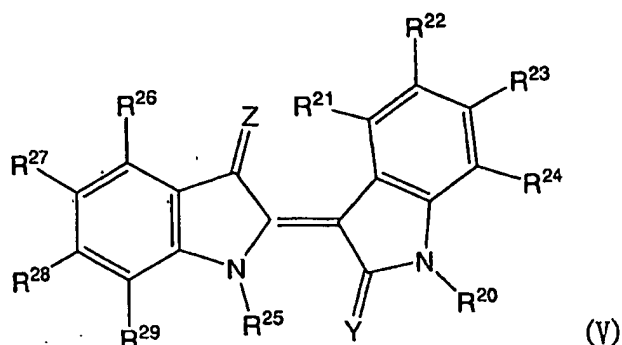
(13) GSK-3を阻害する物質が、9-シアノ-7,12-ジヒドロ-インドロ  
 [3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、9-ブromo-7,12-ジヒドロ-2,3-ジメトキシ  
 -インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、2-ブromo-7,12-ジヒドロ-9-ト  
 リフルオロメチル-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、7,12-ジヒド  
 15 ロ-2,3-ジメトキシ-9-トリフルオロメチル-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン  
 -6(5H)-オン、2,9-ジブromo-7,12-ジヒドロ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン  
 -6(5H)-オン、7,12-ジヒドロ-9-トリフルオロメチル-インドロ[3,2-d][1]ベンズア  
 ゼピン-6(5H)-オン、9-クロロ-7,12-ジヒドロ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン  
 -6(5H)-オン、8-ブromo-6,11-ジヒドロ-チエノ[3',2':2,3]アゼピノ[4,5-b]インド  
 20 ール-5(4H)-オン、7,12-ジヒドロ-9-メトキシ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン  
 -6(5H)-オン、10-ブromo-7,12-ジヒドロ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン  
 -6(5H)-オン、11-ブromo-7,12-ジヒドロ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン  
 -6(5H)-オン、11-クロロ-7,12-ジヒドロ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン  
 -6(5H)-オン、9-フルオロ-7,12-ジヒドロ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン  
 25 -6(5H)-オン、9-メチル-7,12-ジヒドロ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン  
 -6(5H)-オン、9-ブromo-7,12-ジヒドロ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン  
 -6(5H)-チオン、8,10-ジクロロ-7,12-ジヒドロ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピ  
 ン-6(5H)-オン、9-ブromo-7,12-ジヒドロ-12-(2-ヒドロキシエチル)-インドロ  
 [3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、9-ブromo-7,12-ジヒドロ-2,3-ジヒドロキ

シ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、2-プロモ-7,12-ジヒドロ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、7,12-ジヒドロ-2,3-ジメトキシ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、9-プロモ-7,12-ジヒドロ-12-メチル-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、9-プロモ-7,12-ジヒドロ-5-メチルオキシカルボニルメチル-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オンおよび7,12-ジヒドロ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オンからなる群より選ばれる化合物またはその薬理学的に許容される塩である上記(1)～(3)のいずれか1つの医薬。

(14) GSK-3を阻害する物質が、9-シアノ-7,12-ジヒドロ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、9-プロモ-7,12-ジヒドロ-2,3-ジメトキシ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、2-プロモ-7,12-ジヒドロ-9-トリフルオロメチル-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、7,12-ジヒドロ-2,3-ジメトキシ-9-トリフルオロメチル-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、2,9-ジプロモ-7,12-ジヒドロ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、7,12-ジヒドロ-9-トリフルオロメチル-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、9-クロロ-7,12-ジヒドロ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、8-プロモ-6,11-ジヒドロ-チエノ[3',2':2,3]アゼピノ[4,5-b]インドール-5(4H)-オンおよび7,12-ジヒドロ-9-メトキシ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オンからなる群より選ばれる化合物またはその薬理学的に許容される塩である上記(1)～(3)のいずれか1つの医薬。

(15) GSK-3を阻害する物質が、9-プロモ-7,12-ジヒドロ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オンまたはその薬理学的に許容される塩である上記(1)～(3)のいずれか1つの医薬。

(16) GSK-3を阻害する物質が、式(V)



- [式中、同じか異なってよい $R^{20}$ および $R^{25}$ は水素原子；ハロゲン；ヒドロキシ基；メチレンヒドロキシ基；直鎖または分枝鎖の $C_1\sim C_{18}$ -アルキルまたはアルコキシまたはメチレンアルコキシ基；必要に応じて1個または複数のヘテロ原子を含む、
- 5 3から7個-炭素原子を有するシクロアルキル基；必要に応じて1個または複数のヘテロ原子を有する置換または非置換のアリール、アラルキルまたはアリールオキシ基；それぞれ互いに独立に、直鎖または分枝鎖のアルキル基中に1から6個の炭素原子を有するモノー、ジ-またはトリアルキルシリル基；それぞれ互いに独立に置換または非置換アリール基を有するモノー、ジ-またはトリアリールシリル基；
- 10 トリフルオロメチル基；-COM；-COOM；あるいは-CH<sub>2</sub>COOM基（ここでMは水素原子、必要ならばヒドロキシおよび／またはアミノ基1個または複数の置換された直鎖または分枝鎖の $C_1\sim C_{18}$ -アルキル基、または必要ならば1個または複数のヘテロ原子を有し、1個または複数のハロゲン、アルキル基またはアルコキシ基で置換されていてよいアリール基を表す）；-NR<sup>30</sup>R<sup>31</sup>基（ここで同じか
- 15 異なってよい $R^{30}$ および $R^{31}$ は水素原子、必要ならば付加的に1個または複数のヒドロキシおよび／またはアミノ基で置換されている $C_1\sim C_{18}$ 直鎖または分枝鎖アルキル基、置換または非置換で、必要ならば1個または複数のヘテロ原子を含むアリール基を表す）；アシル基；-CH<sub>2</sub>-NR<sup>30</sup>R<sup>31</sup>メチレンアミノ基（ここで $R^{30}$ および $R^{31}$ は前記の意味を有する）；ベンゼン環が必要ならば1個または複数のヘ
- 20 テロ原子を有するベンジル基；必要ならば1個または複数のヘテロ原子を有する、炭素原子3から7個を有するメチレンシクロアルキル基；アミドとしての、窒素原子に結合した生理的アミノ酸基；グリコシドが単糖または二糖から選択されるO-グリコシドまたはN-グリコシド；あるいはメチレンスルホネート基を表し；同じか異なってよい $R^{21}$ 、 $R^{22}$ 、 $R^{23}$ 、 $R^{24}$ 、 $R^{26}$ 、 $R^{27}$ 、 $R^{28}$  および $R^{29}$  は水素原子；

ハロゲン；ヒドロキシ基；ニトロソ基；ニトロ基；アルコキシ基；必要ならば1個または複数のヒドロキシおよび／またはアミノ基で置換されている直鎖または分枝鎖の $C_1 \sim C_{18}$  アルキル基；必要ならば1個または複数のヘテロ原子を有する置換または非置換のアリール基；必要ならば1個または複数のヘテロ原子を有する置換または非置換アラルキル基；必要ならば1個または複数のヘテロ原子を有する置換または非置換アリールオキシ基；必要ならば1個または複数のヘテロ原子を有する置換または非置換メチレンアリールオキシ基；必要ならば1個または複数のヘテロ原子を含む、3から7個の炭素原子を有するシクロアルキル基；必要ならば1個または複数のヘテロ原子を含む、3から7個の炭素原子を有するメチレンシクロアルキル基；トリフルオロメチル基； $-COM$ ； $-COOM$ ；または $CH_2COOM$ 基（ここでMは水素原子、必要ならばヒドロキシおよび／またはアミノ基1個または複数の付加的に置換された直鎖または分枝鎖の $C_1 \sim C_{18}$ -アルキル基、または必要ならば1個または複数のヘテロ原子を有し、1個または複数のハロゲン原子、アルキル基またはアルコキシ基で置換されていてよいアリール基を表す）； $-NR^{30}$   
15  $R^{31}$ 基（ここで同じか異なってよい $R^{30}$ および $R^{31}$ は水素原子、必要ならば付加的に1個または複数のヒドロキシおよび／またはアミノ基で置換されている直鎖または分枝鎖 $C_1 \sim C_{18}$  アルキル基、置換または非置換で、必要ならば1個または複数のヘテロ原子を含むアリール基、アシル基を表すか、窒素原子が、必要ならば1個または複数のヘテロ原子を含む、炭素原子3から7個を有するシクロアルキルの一部を形成する）； $-CONR^{30}R^{31}$ 基（ここで $R^{30}$ および $R^{31}$ は前記の意味を有する）；ヒドロキシルアミノ基；ホスフェート基；ホスホネート基；スルフェート基；スルホネート基；スルホンアミド基； $-SO_2NR^{30}R^{31}$ 基（ここで $R^{30}$ および $R^{31}$ は前記の意味を有する）； $-N=N-R^{32}$ アゾ基（ここで $R^{32}$ は必要ならば1個または複数のカルボキシル、ホスホリルまたはスルホネート基で置換された芳香族基  
20 あるいはグリコシドが単糖または二糖から選択されているO-グリコシドまたはN-グリコシド基を表す）を表すか； $R^{20}$ および $R^{24}$ ならびに $R^{25}$ および $R^{29}$ はそれぞれ一緒になって、互いに独立に必要なならば置換された1から4個の $CH_2$ 基を有する環を形成し；同じか異なってよいYおよびZは酸素；イオウ；セレン；テルルの原子； $NR^{33}$ 基（ここで $R^{33}$ は水素原子、必要ならば1個または複数のカルボ

キシル、ホスホリルまたはスルホネート基で置換された直鎖または分枝鎖  $C_1 \sim C_{18}$  アルキル基、必要ならば1個または複数のヘテロ原子を含む置換または非置換のアリール基、アラルキル基またはスルホネート基を表す) ;あるいは  $-NOR^{33}$  (ここで  $R^{33}$  基は前記の意味を有する) を表す] で表される化合物またはそれらの薬理学的に許容される塩である上記 (1) ~ (3) のいずれか1つの医薬。

(17) GSK-3を阻害する物質が、インジルピン、5-ヨード-インジルピン、5-ブロモ-インジルピン、5-クロロ-インジルピン、5-フルオロ-インジルピン、5-メチル-インジルピン、5-ニトロ-インジルピン、5- $SO_3H$ -インジルピン、5'-ブロモ-インジルピン、5-5'-ジブロモ-インジルピンおよび5'-ブロモ-インジルピン5-スルホン酸からなる群より選ばれる化合物またはその薬理学的に許容される塩である上記 (1) ~ (3) のいずれか1つの医薬。

(18) GSK-3を阻害する物質が、インジルピン-3'-モノオキシム、5-ヨード-インジルピン-3'-モノオキシムおよび5- $SO_3Na$ -インジルピン-3'-モノオキシムからなる群より選ばれる化合物またはその薬理学的に許容される塩である上記 (1) ~ (3) のいずれか1つの医薬。

(19) GSK-3を阻害する物質が、インジルピン-3'-モノオキシムまたはその薬理学的に許容される塩である上記 (1) ~ (3) のいずれか1つの医薬。

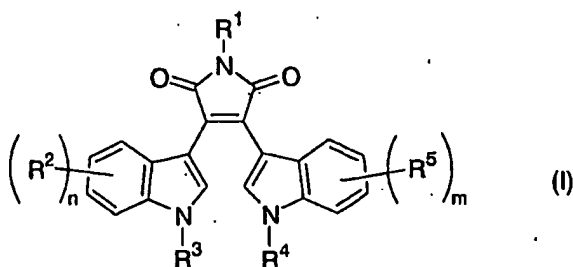
(20) GSK-3の活性を阻害する物質を有効成分として含有してなる神経幹細胞のニューロン新生促進剤。

(21) GSK-3の活性を阻害する物質が、リチウムまたはその薬理学的に許容される塩である上記 (20) のニューロン新生促進剤。

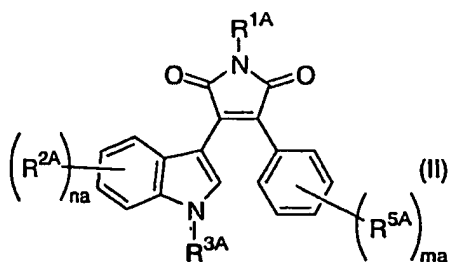
(22) GSK-3の活性を阻害する物質が、ビスインドリルマレイミド誘導体、3-アリール-4-インドリルマレイミド誘導体、インドロカルバゾール誘導体、インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン誘導体もしくはインジルピン誘導体またはそれらの薬理学的に許容される塩である上記 (20) のニューロン新生促進剤。

(23) GSK-3の活性を阻害する物質が、式(I)

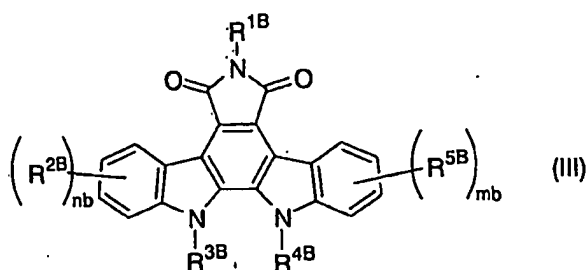




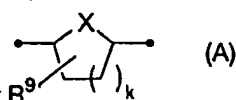
- 〔式中、 $n$  および  $m$  は同一または異なって、1～3 の整数を表し、 $R^1$ 、 $R^3$  および  $R^4$  は同一または異なって、水素原子、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換の低級アルケニル、 $-\text{COR}^6$  (式中、 $R^6$  は水素原子、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換の低級アルケニル、置換もしくは非置換のアリールまたは置換もしくは非置換のシクロアルキルを表す)、 $-\text{COOR}^7$  (式中、 $R^7$  は水素原子、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換のアリールまたは置換もしくは非置換のシクロアルキルを表す) または  $-\text{OR}^8$  (式中、 $R^8$  は水素原子、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換のアリールまたは置換もしくは非置換のシクロアルキルを表す) を表し、 $R^2$  および  $R^5$  は同一または異なって、水素原子、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換の低級アルケニル、置換もしくは非置換の低級アルコキシ、置換もしくは非置換の低級アルコキシカルボニル、置換もしくは非置換のアリール、カルボキシ、ハロゲン、ヒドロキシ、ニトロ、アミノまたはモノもしくはジ低級アルキルアミノを表し、 $n$  および  $m$  がそれぞれ 2 または 3 であるとき、それぞれの  $R^2$  および  $R^5$  は同一でも異なってもよい〕で表される化合物、式(II)



(式中、 $na$ 、 $ma$ 、 $R^{1A}$ 、 $R^{2A}$ 、 $R^{3A}$  および  $R^{5A}$  は、それぞれ前記  $n$ 、 $m$ 、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$  および  $R^5$  と同義である) で表される化合物もしくは式(III)

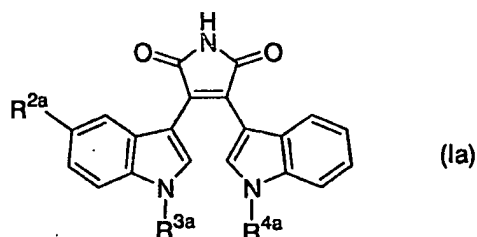


〔式中、nb、mb、 $R^{1B}$ 、 $R^{2B}$  および  $R^{5B}$  は、それぞれ前記 n、m、 $R^1$ 、 $R^2$  および  $R^5$  と同義であり、 $R^{3B}$  および  $R^{4B}$  は同一または異なって、水素原子、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換の低級アルケニル、 $-\text{COR}^6$  (式中、 $R^6$  は前記と同義である)、 $-\text{COOR}^7$  (式中、 $R^7$  は前記と同義である) または  $-\text{OR}^8$  (式中、 $R^8$  は前記と同義である) を表すか、または  $R^{3B}$  と  $R^{4B}$  が一緒になって、



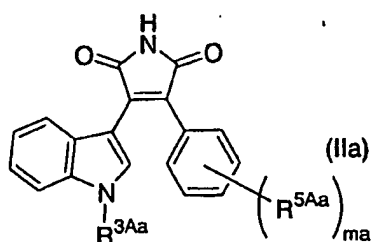
(式中、k は 1 または 2 を表し、X は  $\text{CH}_2$ 、NH、酸素原子または硫黄原子を表し、 $R^9$  はヒドロキシ、カルボキシ、カルバモイルまたは低級アルコキシカルボニルを表す) を形成する] で表される化合物またはそれらの薬理学的に許容される塩である上記 (20) のニューロン新生促進剤。

(24) GSK-3 の活性を阻害する物質が、式 (Ia)



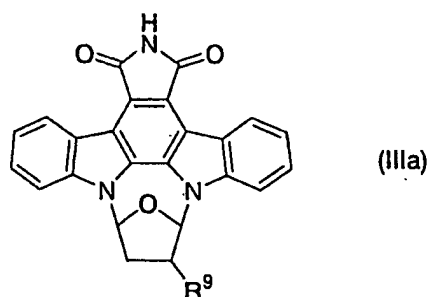
(式中、 $R^{2a}$  は水素原子、低級アルコキシ、低級アルコキシカルボニル、アリールまたはニトロを表し、 $R^{3a}$  および  $R^{4a}$  は同一または異なって、置換もしくは非置換の低級アルキルを表す) で表される化合物またはその薬理学的に許容される塩である上記 (20) のニューロン新生促進剤。

(25) GSK-3 の活性を阻害する物質が、式 (IIa)



(式中、 $m_a$  は前記と同義であり、 $R^{3Aa}$  は置換もしくは非置換の低級アルキルを表し、 $R^{5Aa}$  はハロゲンを表す) で表される化合物またはその薬理学的に許容される塩である上記 (20) のニューロン新生促進剤。

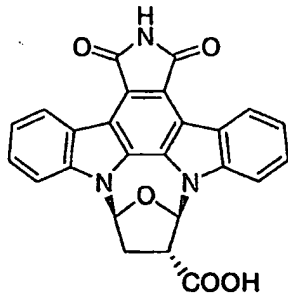
5 (26) GSK-3の活性を阻害する物質が、式(IIIa)



(式中、 $R^9$  は前記と同義である) で表される化合物またはその薬理学的に許容される塩である上記 (20) のニューロン新生促進剤。

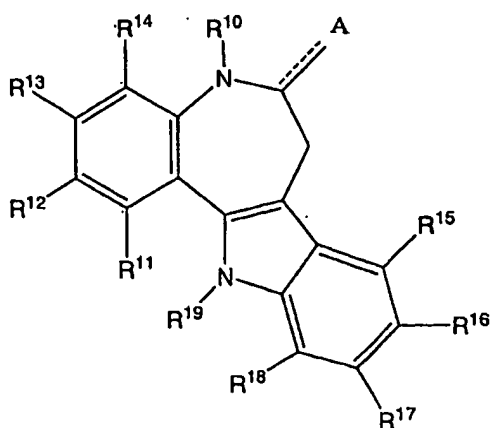
(27) GSK-3の活性を阻害する物質が、3, 4-ビス(1-メチルインドール-3-イル)-1H-ピロール-2, 5-ジオン、3-(1-メチルインドール-3-イル)-4-(1-プロピルインドール-3-イル)-1H-ピロール-2, 5-ジオン、3-[1-(3-シアノプロピル)インドール-3-イル]-4-(1-メチルインドール-3-イル)-1H-ピロール-2, 5-ジオン、3-[1-(3-アミノプロピル)インドール-3-イル]-4-(1-メチルインドール-3-イル)-1H-ピロール-2, 5-ジオン、3-[1-(3-カルボキシプロピル)インドール-3-イル]-4-(1-メチルインドール-3-イル)-1H-ピロール-2, 5-ジオン、3-[1-(3-カルバモイルプロピル)インドール-3-イル]-4-(1-メチルインドール-3-イル)-1H-ピロール-2, 5-ジオン、3-[1-(3-アミノプロピル)インドール-3-イル]-4-(1-メチル-5-プロピルオキシインドール-3-イル)-1H-ピロール-2, 5-ジオン、3-[1-(3-ヒドロキシプロピル)インドール-3-イル]-4-(1-メチル-5-フェニルインドール-3-イル)-1H-ピロール

- 2, 5-ジオン、3-[1-(3-アミノプロピル)インドール-3-イル]-4-(1-メチル-5-フェニルインドール-3-イル)-1H-ピロール-2, 5-ジオン、3-[1-(3-ヒドロキシプロピル)インドール-3-イル]-4-(1-メチル-5-メトキシカルボニルインドール-3-イル)-1H-ピロール-2, 5-ジオン、3-[1-(3-ヒドロキシプロピル)インドール-3-イル]-4-(1-メチル-5-ニトロインドール-3-イル)-1H-ピロール-2, 5-ジオン、3-(1-メチルインドール-3-イル)-4-[1-(3-ヒドロキシプロピル)-5-ニトロインドール-3-イル]-1H-ピロール-2, 5-ジオン、3-(2-クロロフェニル)-4-(1-メチルインドール-3-イル)-1H-ピロール-2, 5-ジオン、3-(2, 4-ジクロロフェニル)-4-(1-メチルインドール-3-イル)-1H-ピロール-2, 5-ジオン、3-(2-クロロフェニル)-4-[1-(3-ヒドロキシプロピル)インドール-3-イル]-1H-ピロール-2, 5-ジオン、4-[1-(3-アミノプロピル)インドール-3-イル]-3-(2-クロロフェニル)-1H-ピロール-2, 5-ジオンおよび



からなる群より選ばれる化合物またはその薬理学的に許容される塩である上記(20)のニューロン新生促進剤。

(28) GSK-3を阻害する物質が、式(IV)



(IV)

〔式中、Aは単結合または二重結合によって右に結合されている酸素または硫黄であり、R<sup>10</sup>は水素原子、アリール、低級脂肪族置換基、特にアルキルおよび低級アルキルエステルからなる群より選択され、R<sup>11</sup>~R<sup>14</sup>はアルコキシ、アミノ、アシル、脂肪族置換基、特にアルキル、アルケニルおよびアルキニル置換基、脂肪族アルコール、特にアルキルアルコール、脂肪族ニトリル、特にアルキルニトリル、シアノ、ニトロ、カルボキシル、ハロゲン、水素原子、ヒドロキシル、イミノならびに  $\alpha$ 、 $\beta$  不飽和ケトンからなる群より個別に選択され、R<sup>15</sup>~R<sup>18</sup>は脂肪族置換基、特にアルキル、アルケニルおよびアルキニル置換基、特に低級脂肪族置換基、脂肪族アルコール、特にアルキルアルコール、アルコキシ、アシル、シアノ、ニトロ、エポキシ、ハロアルキル基、ハロゲン、水素原子ならびにヒドロキシルからなる群より個別に選択され、R<sup>19</sup>は脂肪族の基、特に低級アルキル基、脂肪族アルコール、特にアルキルアルコール、カルボン酸、および水素からなる群より選択される〕で表される化合物またはその薬理学的に許容される塩である上記(20)のニューロン新生促進剤。

(29) GSK-3を阻害する物質が、7,12-ジヒドロ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、2-プロモ-7,12-ジヒドロ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、9-プロモ-7,12-ジヒドロ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、9-クロロ-7,12-ジヒドロ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、11-クロロ-7,12-ジヒドロ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、10-プロモ-7,12-ジヒドロ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、8-プロモ-6,11-ジヒドロ-チエノ[3',2':2,3アゼピノ[4,5-b]インドール-5(4H)-オン、9-プロモ-7,12-ジヒドロ-4-メトキシ-インドロ[3,2-d][1]ベン

- ズアゼピン-6(5H)-オン、9-ブロモ-7,12-ジヒドロ-4-ヒドロキシ-インドロ  
[3,2-d] [1] ベンズアゼピン-6(5H)-オン、7,12-ジヒドロ-4-メトキシ-インドロ  
[3,2-d] [1] ベンズアゼピン-6(5H)-オン、9-ブロモ-7,12-ジヒドロ-2,3-ジメトキシ  
-インドロ [3,2-d] [1] ベンズアゼピン-6(5H)-オン、9-ブロモ-7,12-ジヒドロ-2,3-  
5 ジヒドロキシ-インドロ [3,2-d] [1] ベンズアゼピン-6(5H)-オン、7,12-ジヒドロ  
-2,3-ジメトキシ-インドロ [3,2-d] [1] ベンズアゼピン-6(5H)-オン、7,12-ジヒドロ  
-9-トリフルオロメチル-インドロ [3,2-d] [1] ベンズアゼピン-6(5H)-オン、7,12-ジ  
ヒドロ-2,3-ジメトキシ-9-トリフルオロメチル-インドロ [3,2-d] [1] ベンズアゼピ  
ン-6(5H)-オン、2-ブロモ-7,12-ジヒドロ-9-トリフルオロメチル-インドロ  
10 [3,2-d] [1] ベンズアゼピン-6(5H)-オン、9-ブロモ-7,12-ジヒドロ-インドロ  
[3,2-d] [1] ベンズアゼピン-6(5H)-チオン、9-ブロモ-5,12-ビス-(*t*-ブチルオキシ  
カルボニル)-7,12-ジヒドロ-インドロ [3,2-d] [1] ベンズアゼピン-6(5H)-オン、9-  
ブロモ-12-(*t*-ブチルオキシカルボニル)-7,12-ジヒドロ-インドロ [3,2-d] [1] ベン  
ズアゼピン-6(5H)-オン、9-ブロモ-5,7-ビス-(*t*-ブチルオキシカルボニル)-7,12-  
15 ジヒドロ-インドロ [3,2-d] [1] ベンズアゼピン-6(5H)-オン、9-ブロモ-5,7,12-トリ  
-(*t*-ブチルオキシカルボニル)-7,12-ジヒドロ-インドロ [3,2-d] [1] ベンズアゼピ  
ン-6(5H)-オン、9-ブロモ-7,12-ジヒドロ-5-メチルオキシカルボニルメチル-イン  
ドロ [3,2-d] [1] ベンズアゼピン-6(5H)-オン、9-ブロモ-7,12-ジヒドロ-12-メチル  
オキシカルボニルメチル-インドロ [3,2-d] [1] ベンズアゼピン-6(5H)-オン、9-プロ  
20 モ-7,12-ジヒドロ-12-(2-ヒドロキシエチル)-インドロ [3,2-d] [1] ベンズアゼピン  
-6(5H)-オン、2,9-ジブロモ-7,12-ジヒドロ-インドロ [3,2-d] [1] ベンズアゼピン  
-6(5H)-オン、8,10-ジクロロ-7,12-ジヒドロ-インドロ [3,2-d] [1] ベンズアゼピン  
-6(5H)-オン、9-シアノ-7,12-ジヒドロ-インドロ [3,2-d] [1] ベンズアゼピン  
-6(5H)-オン、9-ブロモ-7,12-ジヒドロ-5-メチル-インドロ [3,2-d] [1] ベンズアゼ  
25 ピン-6(5H)-オン、5-ベンジル-9-ブロモ-7,12-ジヒドロ-5-メチル-インドロ  
[3,2-d] [1] ベンズアゼピン-6(5H)-オン、9-ブロモ-7,12-ジヒドロ-12-メチル-イン  
ドロ [3,2-d] [1] ベンズアゼピン-6(5H)-オン、9-ブロモ-12-エチル-7,12-ジヒドロ-  
インドロ [3,2-d] [1] ベンズアゼピン-6(5H)-オン、9-ブロモ-7,12-ジヒドロ-12-(2-  
プロペニル)-インドロ [3,2-d] [1] ベンズアゼピン-6(5H)-オン、7,12-ジヒドロ-9-

- メチル-インドロ[3, 2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、7, 12-ジヒドロ-9-メトキシ-インドロ[3, 2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、9-フルオロ-7, 12-ジヒドロ-12-(2-プロペニル)-インドロ[3, 2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、11-プロモ-7, 12-ジヒドロ-インドロ[3, 2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、9-プロモ-7, 12-ジヒドロ-2-(メチルイミノアミン)-インドロ[3, 2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、9-プロモ-7, 12-ジヒドロ-2-(カルボン酸)-インドロ[3, 2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、9-プロモ-7, 12-ジヒドロ-10-ヒドロキシ-インドロ[3, 2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、9-プロモ-7, 12-ジヒドロ-11-ヒドロキシメチル-インドロ[3, 2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、7, 12-ジヒドロ-4-ヒドロキシ-インドロ[3, 2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、7, 12-ジヒドロ-2, 3-ジヒドロキシ-インドロ[3, 2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、2, 3-ジメトキシ-9-ニトロ-7, 12-ジヒドロ-インドロ[3, 2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、9-シアノ-7, 12-ジヒドロ-インドロ[3, 2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、2, 3-ジメトキシ-9-シアノ-7, 12-ジヒドロ-インドロ[3, 2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、9-ニトロ-7, 12-ジヒドロ-インドロ[3, 2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、3-(6-オキソ-9-トリフルオロメチル-5, 6, 7, 12-テトラヒドロ-インドロ[3, 2-d][1]ベンズアゼピン-2-イル)プロピオニトリル、2-プロモ-9-ニトロ-7, 12-ジヒドロ-インドロ[3, 2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、3-(6-オキソ-9-トリフルオロメチル-5, 6, 7, 12-テトラヒドロ-インドロ[3, 2-d][1]ベンズアゼピン-2-イル)アクリロニトリル、2-(3-ヒドロキシ-1-プロピニル)-9-トリフルオロメチル-7, 12-ジヒドロ-インドロ[3, 2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、2-ヨード-9-プロモ-7, 12-ジヒドロ-インドロ[3, 2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、2-(3-オキソ-1-ブテニル)-9-トリフルオロメチル-7, 12-テトラヒドロ-インドロ[3, 2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、8-クロロ-6, 11-ジヒドロ-チエノ[3', 2': 2, 3]アゼピノ[4, 5-b]インドール-5(4H)-オン、2-ヨード-9-トリフルオロメチル-7, 12-ジヒドロ-インドロ[3, 2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、7, 12-ジヒドロ-ピリド[3', 2': 4, 5]ピロロ[3, 2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、11-メチル-7, 12-ジヒドロ-インドロ[3, 2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、2-[2-(1-ヒドロキシシクロヘキシル)エチニル]-9-トリフルオロメチル-7, 12-ジヒドロ-インドロ[3, 2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、2-シアノ-7, 12-ジヒドロ-

インドロ[3, 2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、2-ヨード-7, 12-ジヒドロ-インドロ[3, 2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、11-エチル-7, 12-ジヒドロ-インドロ[3, 2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、8-メチル-6, 11-ジヒドロ-チエノ[3', 2':2, 3]アゼピノ[4, 5-b]インドール-5(4H)-オンおよび3-(6-オキソ-9-トリフルオロメチル-5, 6, 7, 12-テトラヒドロ-インドロ[3, 2-d][1]ベンズアゼピン-2-イル)アクリル酸メチルエステルからなる群より選ばれる化合物またはその薬理学的に許容される塩である上記(20)のニューロン新生促進剤。

(30) GSK-3を阻害する物質が、9-シアノ-7, 12-ジヒドロ-インドロ[3, 2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、9-ブromo-7, 12-ジヒドロ-2, 3-ジメトキシ-インドロ[3, 2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、2-ブromo-7, 12-ジヒドロ-9-トリフルオロメチル-インドロ[3, 2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、7, 12-ジヒドロ-2, 3-ジメトキシ-9-トリフルオロメチル-インドロ[3, 2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、2, 9-ジブromo-7, 12-ジヒドロ-インドロ[3, 2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、7, 12-ジヒドロ-9-トリフルオロメチル-インドロ[3, 2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、9-クロロ-7, 12-ジヒドロ-インドロ[3, 2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、8-ブromo-6, 11-ジヒドロ-チエノ[3', 2':2, 3]アゼピノ[4, 5-b]インドール-5(4H)-オン、7, 12-ジヒドロ-9-メトキシ-インドロ[3, 2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、10-ブromo-7, 12-ジヒドロ-インドロ[3, 2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、11-ブromo-7, 12-ジヒドロ-インドロ[3, 2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、11-クロロ-7, 12-ジヒドロ-インドロ[3, 2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、9-フルオロ-7, 12-ジヒドロ-インドロ[3, 2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、9-メチル-7, 12-ジヒドロ-インドロ[3, 2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、9-ブromo-7, 12-ジヒドロ-インドロ[3, 2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-チオン、8, 10-ジクロロ-7, 12-ジヒドロ-インドロ[3, 2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、9-ブromo-7, 12-ジヒドロ-12-(2-ヒドロキシエチル)-インドロ[3, 2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、9-ブromo-7, 12-ジヒドロ-2, 3-ジヒドロキシ-インドロ[3, 2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、2-ブromo-7, 12-ジヒドロ-インドロ[3, 2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、7, 12-ジヒドロ-2, 3-ジメトキシ-インドロ[3, 2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、9-ブromo-7, 12-ジヒドロ-12-メチ



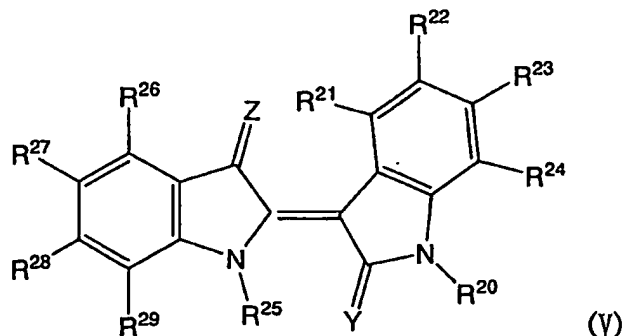
ル-インドロ[3, 2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、9-プロモ-7, 12-ジヒドロ-5-  
メチルオキシカルボニルメチル-インドロ[3, 2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン  
および7, 12-ジヒドロ-インドロ[3, 2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オンからなる群  
より選ばれる化合物またはその薬理学的に許容される塩である上記(20)のニュー

5 ーロン新生促進剤。

(31) GSK-3を阻害する物質が、9-シアノ-7, 12-ジヒドロ-インドロ  
[3, 2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、9-プロモ-7, 12-ジヒドロ-2, 3-ジメトキシ  
-インドロ[3, 2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、2-プロモ-7, 12-ジヒドロ-9-トリ  
フルオロメチル-インドロ[3, 2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、7, 12-ジヒド  
10 ロ-2, 3-ジメトキシ-9-トリフルオロメチル-インドロ[3, 2-d][1]ベンズアゼピン  
-6(5H)-オン、2, 9-ジプロモ-7, 12-ジヒドロ-インドロ[3, 2-d][1]ベンズアゼピン  
-6(5H)-オン、7, 12-ジヒドロ-9-トリフルオロメチル-インドロ[3, 2-d][1]ベンズア  
ゼピン-6(5H)-オン、9-クロロ-7, 12-ジヒドロ-インドロ[3, 2-d][1]ベンズアゼピン  
-6(5H)-オン、8-プロモ-6, 11-ジヒドロ-チエノ[3', 2':2, 3]アゼピノ[4, 5-b]インド  
15 ール-5(4H)-オンおよび7, 12-ジヒドロ-9-メトキシ-インドロ[3, 2-d][1]ベンズア  
ゼピン-6(5H)-オンからなる群より選ばれる化合物またはその薬理学的に許容され  
る塩である上記(20)のニューロン新生促進剤。

(32) GSK-3を阻害する物質が、9-プロモ-7, 12-ジヒドロ-インドロ  
[3, 2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オンまたはその薬理学的に許容される塩である  
20 上記(20)のニューロン新生促進剤。

(33) GSK-3を阻害する物質が、式(V)



[式中、同じか異なってよいR<sup>20</sup>およびR<sup>25</sup>は水素原子；ハロゲン；ヒドロキシ基；  
メチレンヒドロキシ基；直鎖または分枝鎖のC<sub>1</sub>~C<sub>18</sub>-アルキルまたはアルコキシ

またはメチレンアルコキシ基；必要に応じて1個または複数のヘテロ原子を含む、  
3から7個炭素原子を有するシクロアルキル基；必要に応じて1個または複数の  
ヘテロ原子を有する置換または非置換のアリール、アラルキルまたはアリールオキ  
シ基；それぞれ互いに独立に、直鎖または分枝鎖のアルキル基中に1から6個の炭  
5 素原子を有するモノー、ジーまたはトリアルキルシリル基；それぞれ互いに独立に  
置換または非置換アリール基を有するモノー、ジーまたはトリアリールシリル基；  
トリフルオロメチル基； $-COM$ ； $-COOM$ ；あるいは $-CH_2COOM$ 基（こ  
こでMは水素原子、必要ならばヒドロキシおよび／またはアミノ基1個または複数  
で置換された直鎖または分枝鎖の $C_1\sim C_{18}$ アルキル基、または必要ならば1個ま  
10 たは複数のヘテロ原子を有し、1個または複数のハロゲン、アルキル基またはアル  
コキシ基で置換されていてよいアリール基を表す）； $-NR^{30}R^{31}$ 基（ここで同じか  
異なってよい $R^{30}$ および $R^{31}$ は水素原子、必要ならば付加的に1個または複数のヒ  
ドロキシおよび／またはアミノ基で置換されている $C_1\sim C_{18}$ 直鎖または分枝鎖ア  
ルキル基、置換または非置換で、必要ならば1個または複数のヘテロ原子を含むア  
15 リール基を表す）；アシル基； $-CH_2-NR^{30}R^{31}$ メチレンアミノ基（ここで $R^{30}$   
および $R^{31}$ は前記の意味を有する）；ベンゼン環が必要ならば1個または複数のヘ  
テロ原子を有するベンジル基；必要ならば1個または複数のヘテロ原子を有する、  
炭素原子3から7個を有するメチレンシクロアルキル基；アミドとしての、窒素原  
子に結合した生理的アミノ酸基；グリコシドが単糖または二糖から選択されるオー  
20 グリコシドまたはN-グリコシド；あるいはメチレンスルホネート基を表し；同じ  
か異なってよい $R^{21}$ 、 $R^{22}$ 、 $R^{23}$ 、 $R^{24}$ 、 $R^{26}$ 、 $R^{27}$ 、 $R^{28}$ および $R^{29}$ は水素原子；  
ハロゲン；ヒドロキシ基；ニトロソ基；ニトロ基；アルコキシ基；必要ならば1個  
または複数のヒドロキシおよび／またはアミノ基で置換されている直鎖または分  
枝鎖の $C_1\sim C_{18}$ アルキル基；必要ならば1個または複数のヘテロ原子を有する置  
25 換または非置換のアリール基；必要ならば1個または複数のヘテロ原子を有する置  
換または非置換アラルキル基；必要ならば1個または複数のヘテロ原子を有する置  
換または非置換アリールオキシ基；必要ならば1個または複数のヘテロ原子を有す  
る置換または非置換メチレンアリールオキシ基；必要ならば1個または複数のヘテ  
ロ原子を含む、3から7個の炭素原子を有するシクロアルキル基；必要ならば1個

または複数のヘテロ原子を含む、3から7個の炭素原子を有するメチレンシクロアルキル基；トリフルオロメチル基； $-\text{COM}$ ； $-\text{COOM}$ ；または $\text{CH}_2\text{COOM}$ 基（ここでMは水素原子、必要ならばヒドロキシおよび／またはアミノ基1個または複数の付加的に置換された直鎖または分枝鎖の $\text{C}_1\sim\text{C}_{18}$ -アルキル基、または必要ならば1個または複数のヘテロ原子を有し、1個または複数のハロゲン原子、アルキル基またはアルコキシ基で置換されていてよいアリール基を表す）； $-\text{NR}^{30}\text{R}^{31}$ 基（ここで同じか異なってよい $\text{R}^{30}$ および $\text{R}^{31}$ は水素原子、必要ならば付加的に1個または複数のヒドロキシおよび／またはアミノ基で置換されている直鎖または分枝鎖 $\text{C}_1\sim\text{C}_{18}$ アルキル基、置換または非置換で、必要ならば1個または複数のヘテロ原子を含むアリール基、アシル基を表すか、窒素原子が、必要ならば1個または複数のヘテロ原子を含む、炭素原子3から7個を有するシクロアルキルの一部を形成する）； $-\text{CONR}^{30}\text{R}^{31}$ 基（ここで $\text{R}^{30}$ および $\text{R}^{31}$ は前記の意味を有する）；ヒドロキシルアミノ基；ホスフェート基；ホスホネート基；スルフェート基；スルホネート基；スルホンアミド基； $-\text{SO}_2\text{NR}^{30}\text{R}^{31}$ 基（ここで $\text{R}^{30}$ および $\text{R}^{31}$ は前記の意味を有する）； $-\text{N}=\text{N}-\text{R}^{32}$ アゾ基（ここで $\text{R}^{32}$ は必要ならば1個または複数のカルボキシル、ホスホリルまたはスルホネート基で置換された芳香族基あるいはグリコシドが単糖または二糖から選択されているO-グリコシドまたはN-グリコシド基を表す）を表すか； $\text{R}^{20}$ および $\text{R}^{24}$ ならびに $\text{R}^{25}$ および $\text{R}^{29}$ はそれぞれ一緒になって、互いに独立に必要な置換された1から4個の $\text{CH}_2$ 基を有する環を形成し；同じか異なってよいYおよびZは酸素；イオウ；セレン；テルルの原子； $\text{NR}^{33}$ 基（ここで $\text{R}^{33}$ は水素原子、必要ならば1個または複数のカルボキシル、ホスホリルまたはスルホネート基で置換された直鎖または分枝鎖 $\text{C}_1\sim\text{C}_{18}$ アルキル基、必要ならば1個または複数のヘテロ原子を含む置換または非置換のアリール基、アラルキル基またはスルホネート基を表す）；あるいは $-\text{NOR}^{33}$ （ここで $\text{R}^{33}$ 基は前記の意味を有する）を表す]で表される化合物またはそれらの薬理学的に許容される塩である上記(20)のニューロン新生促進剤。

(34) GSK-3を阻害する物質が、インジルビン、5-ヨードインジルビン、5-プロモインジルビン、5-クロロインジルビン、5-フルオロインジルビン、5-メチルインジルビン、5-ニトロインジルビン、 $5-\text{SO}_3$

H-インジルピン、5'-ブromo-インジルピン、5-5'-ジブromo-インジルピンおよび5'-ブromo-インジルピン5-スルホン酸からなる群より選ばれる化合物またはその薬理学的に許容される塩である上記(20)のニューロン新生促進剤。

(35) GSK-3を阻害する物質が、インジルピン-3'-モノオキシム、5-ヨード-インジルピン-3'-モノオキシムおよび5-SO<sub>3</sub>Na-インジルピン-3'-モノオキシムからなる群より選ばれる化合物またはその薬理学的に許容される塩である上記(20)のニューロン新生促進剤。

(36) GSK-3を阻害する物質が、インジルピン-3'-モノオキシムまたはその薬理学的に許容される塩である上記(20)のニューロン新生促進剤。

(37) 上記(20)～(36)のいずれか1つのニューロン新生促進剤の存在下、神経幹細胞を培養して得られるニューロン。

(38) 上記(20)～(36)のいずれか1つのニューロン新生促進剤の存在下、神経幹細胞を培養してニューロンを新生させ、培養物中よりニューロンを採取することを特徴とするニューロンの製造方法。

(39) GSK-3を阻害する物質を投与することを特徴とする神経再生方法。

(40) 神経再生薬の製造のためのGSK-3を阻害する物質の使用。

(41) 神経幹細胞のニューロン新生促進剤の製造のためのGSK-3を阻害する物質の使用。

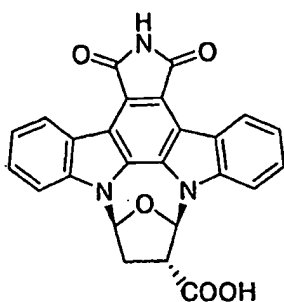
以下、本発明の詳細を説明する。

1. 本発明の神経再生薬および神経幹細胞のニューロン新生促進剤に含有されるGSK-3の活性を阻害する物質

GSK-3の活性を阻害する物質としては、GSK-3の活性を阻害する化合物であればいずれでもよいが、例えばリチウム、ビスインドリルマレイミド誘導体、3-アリール-4-インドリルマレイミド誘導体、インドロカルバゾール誘導体、インドロ[3,2-d][1]ペンズアゼピン-6(5H)-オン誘導体、インジルピン誘導体等があげられる。

ビスインドリルマレイミド誘導体、3-アリール-4-インドリルマレイミド誘導体、インドロカルバゾール誘導体としては、具体的には、例えば式(I)～(III)

で表される化合物があげられる。中でも3, 4-ビス(1-メチルインドール-3-イル)-1H-ピロール-2, 5-ジオン、3-(1-メチルインドール-3-イル)-4-(1-プロピルインドール-3-イル)-1H-ピロール-2, 5-ジオン、3-[1-(3-シアノプロピル)インドール-3-イル]-4-(1-メチルインドール-3-イル)-1H-ピロール-2, 5-ジオン、3-[1-(3-アミノプロピル)インドール-3-イル]-4-(1-メチルインドール-3-イル)-1H-ピロール-2, 5-ジオン、3-[1-(3-カルボキシプロピル)インドール-3-イル]-4-(1-メチルインドール-3-イル)-1H-ピロール-2, 5-ジオン、3-[1-(3-カルバモイルプロピル)インドール-3-イル]-4-(1-メチルインドール-3-イル)-1H-ピロール-2, 5-ジオン、3-[1-(3-アミノプロピル)インドール-3-イル]-4-(1-メチル-5-プロピルオキシインドール-3-イル)-1H-ピロール-2, 5-ジオン、3-[1-(3-ヒドロキシプロピル)インドール-3-イル]-4-(1-メチル-5-フェニルインドール-3-イル)-1H-ピロール-2, 5-ジオン、3-[1-(3-アミノプロピル)インドール-3-イル]-4-(1-メチル-5-フェニルインドール-3-イル)-1H-ピロール-2, 5-ジオン、3-[1-(3-ヒドロキシプロピル)インドール-3-イル]-4-(1-メチル-5-メトキシカルボニルインドール-3-イル)-1H-ピロール-2, 5-ジオン、3-[1-(3-ヒドロキシプロピル)インドール-3-イル]-4-(1-メチル-5-ニトロインドール-3-イル)-1H-ピロール-2, 5-ジオン、3-(1-メチルインドール-3-イル)-4-[1-(3-ヒドロキシプロピル)-5-ニトロインドール-3-イル]-1H-ピロール-2, 5-ジオン、3-(2-クロロフェニル)-4-(1-メチルインドール-3-イル)-1H-ピロール-2, 5-ジオン、3-(2, 4-ジクロロフェニル)-4-(1-メチルインドール-3-イル)-1H-ピロール-2, 5-ジオン、3-(2-クロロフェニル)-4-[1-(3-ヒドロキシプロピル)インドール-3-イル]-1H-ピロール-2, 5-ジオン、3-[1-(3-アミノプロピル)インドール-3-イル]-4-(2-クロロフェニル)-1H-ピロール-2, 5-ジオンおよび



等が好ましい。

- インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン誘導体としては、具体的には、  
 例えば式(IV)で表される化合物があげられる。中でも7,12-ジヒドロ-インドロ
- 5 [3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、2-プロモ-7,12-ジヒドロ-インドロ  
 [3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、9-プロモ-7,12-ジヒドロ-インドロ  
 [3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、9-クロロ-7,12-ジヒドロ-インドロ  
 [3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、11-クロロ-7,12-ジヒドロ-インドロ  
 [3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、10-プロモ-7,12-ジヒドロ-インドロ
- 10 [3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、8-プロモ-6,11-ジヒドロ-チエノ  
 [3',2':2,3アゼピノ[4,5-b]インドール-5(4H)-オン、9-プロモ-7,12-ジヒドロ-4-  
 メトキシ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、9-プロモ-7,12-ジヒド  
 ロ-4-ヒドロキシ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、7,12-ジヒドロ  
 -4-メトキシ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、9-プロモ-7,12-ジ
- 15 ヒドロ-2,3-ジメトキシ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、9-プロ  
 モ-7,12-ジヒドロ-2,3-ジヒドロキシ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-  
 オン、7,12-ジヒドロ-2,3-ジメトキシ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-  
 オン、7,12-ジヒドロ-9-トリフルオロメチル-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン  
 -6(5H)-オン、7,12-ジヒドロ-2,3-ジメトキシ-9-トリフルオロメチル-インドロ
- 20 [3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、2-プロモ-7,12-ジヒドロ-9-トリフルオロ  
 メチル-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、9-プロモ-7,12-ジヒドロ  
 -インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-チオン、9-プロモ-5,12-ビス-(*t*-ブチ  
 ルオキシカルボニル)-7,12-ジヒドロ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-  
 オン、9-プロモ-12-(*t*-ブチルオキシカルボニル)-7,12-ジヒドロ-インドロ
- 25 [3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、9-プロモ-5,7-ビス-(*t*-ブチルオキシカル

- ボニル)-7,12-ジヒドロ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、9-プロモ-5,7,12-トリ-(1-ブチルオキシカルボニル)-7,12-ジヒドロ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、9-プロモ-7,12-ジヒドロ-5-メチルオキシカルボニルメチル-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、9-プロモ-7,12-ジヒドロ-12-メチルオキシカルボニルメチル-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、9-プロモ-7,12-ジヒドロ-12-(2-ヒドロキシエチル)-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、2,9-ジプロモ-7,12-ジヒドロ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、8,10-ジクロロ-7,12-ジヒドロ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、9-シアノ-7,12-ジヒドロ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、9-プロモ-7,12-ジヒドロ-5-メチル-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、5-ベンジル-9-プロモ-7,12-ジヒドロ-5-メチル-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、9-プロモ-7,12-ジヒドロ-12-メチル-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、9-プロモ-12-エチル-7,12-ジヒドロ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、9-プロモ-7,12-ジヒドロ-12-(2-プロペニル)-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、7,12-ジヒドロ-9-メチル-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、7,12-ジヒドロ-9-メトキシ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、9-フルオロ-7,12-ジヒドロ-12-(2-プロペニル)-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、11-プロモ-7,12-ジヒドロ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、9-プロモ-7,12-ジヒドロ-2-(メチルイミノアミン)-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、9-プロモ-7,12-ジヒドロ-2-(カルボン酸)-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、9-プロモ-7,12-ジヒドロ-10-ヒドロキシ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、9-プロモ-7,12-ジヒドロ-11-ヒドロキシメチル-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、7,12-ジヒドロ-4-ヒドロキシ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、7,12-ジヒドロ-2,3-ジヒドロキシ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、2,3-ジメトキシ-9-ニトロ-7,12-ジヒドロ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、9-シアノ-7,12-ジヒドロ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、2,3-ジメトキシ-9-シアノ-7,12-ジヒドロ-インドロ[3,2-d][1]ベン

ズアゼピン-6(5H)-オン、9-ニトロ-7,12-ジヒドロ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼ  
 ピン-6(5H)-オン、3-(6-オキソ-9-トリフルオロメチル-5,6,7,12-テトラヒドロ-イ  
 ンドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-2-イル)プロピオニトリル、2-ブromo-9-ニトロ  
 -7,12-ジヒドロ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、3-(6-オキソ-9-  
 5 トリフルオロメチル-5,6,7,12-テトラヒドロ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン  
 -2-イル)アクリロニトリル、2-(3-ヒドロキシ-1-プロピニル)-9-トリフルオロメ  
 チル-7,12-ジヒドロ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、2-ヨード  
 -9-ブromo-7,12-ジヒドロ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、2-(3-  
 オキソ-1-ブテニル)-9-トリフルオロメチル-7,12-テトラヒドロ-インドロ  
 10 [3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、8-クロロ-6,11-ジヒドロ-チエノ  
 [3',2':2,3]アゼピノ[4,5-b]インドール-5(4H)-オン、2-ヨード-9-トリフルオロメ  
 チル-7,12-ジヒドロ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、7,12-ジヒ  
 ドロ-ピリド[3',2':4,5]ピロロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、11-メチル  
 -7,12-ジヒドロ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、2-[2-(1-ヒドロ  
 15 キシシクロヘキシル)エチニル]-9-トリフルオロメチル-7,12-ジヒドロ-インドロ  
 [3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、2-シアノ-7,12-ジヒドロ-インドロ  
 [3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、2-ヨード-7,12-ジヒドロ-インドロ  
 [3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、11-エチル-7,12-ジヒドロ-インドロ  
 [3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、8-メチル-6,11-ジヒドロ-チエノ  
 20 [3',2':2,3]アゼピノ[4,5-b]インドール-5(4H)-オンおよび3-(6-オキソ-9-トリフ  
 ルオロメチル-5,6,7,12-テトラヒドロ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-2-イ  
 ル)アクリル酸メチルエステル等が好ましい。

インジルピン誘導体としては、具体的には、例えば式(V)で表される化合物が  
 あげられる。中でもインジルピン、5-ヨード-インジルピン、5-ブromo-イン  
 25 ジルピン、5-クロロ-インジルピン、5-フルオロ-インジルピン、5-メチル  
 -インジルピン、5-ニトロ-インジルピン、5-SO<sub>3</sub>H-インジルピン、5'-  
 ブromo-インジルピン、5-5'-ジブromo-インジルピン、5'-ブromo-インジ  
 ルピン5-スルホン酸、インジルピン-3'-モノオキシム、5-ヨード-インジル  
 ピン-3'-モノオキシムおよび5-SO<sub>3</sub>Na-インジルピン-3'-モノオキシ



ム等が好ましい。

以下、式 (I) ~ (V) で表される化合物をそれぞれ化合物 (I) ~ (V) という。  
他の式番号の化合物についても同様である。

化合物 (I) ~ (III) および化合物 (Ia) ~ (IIIa) の各基の定義において、以

5 下の例示があげられる。

(i) 低級アルキル、低級アルコキシおよび低級アルコキシカルボニルの低級アルキル部分としては、例えば直鎖または分岐状の炭素数 1~10 のアルキルがあげられ、具体的にはメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、イソペンチル、ネオペンチル、ヘキシル、ヘ  
10 プチル、オクチル、6-メチルヘプチル、イソオクチル、ノニル、デシル等があげられる。

(ii) シクロアルキルとしては、例えば炭素数 3~8 のシクロアルキルがあげられ、具体的にはシクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル等があげられる。

15 (iii) 低級アルケニルとしては、例えば直鎖、分岐または環状の炭素数 2~8 のアルケニルがあげられ、具体的にはビニル、アリル、1-プロペニル、ブテニル、ペンテニル、ヘキセニル、ヘプテニル、オクテニル、シクロヘキセニル、2, 6-オクタジエニル等があげられる。

(iv) モノもしくはジ低級アルキルアミノの低級アルキル部分は、前記低級アルキル  
20 と同義であり、ジ低級アルキルアミノの2つの低級アルキル部分は、同一でも異な  
っていてもよい。

(v) ハロゲンとは、フッ素、塩素、臭素およびヨウ素の各原子を表す。

(vi) アリールとしては、例えば炭素数 6~14 の単環式、二環式または三環式のアリ  
ールがあげられ、具体的にはフェニル、ナフチル、インデニル、アントラニル等が  
25 あげられる。

(vii) 置換低級アルキル、置換低級アルケニル、置換低級アルコキシおよび置換低級  
アルコキシカルボニルにおける置換基としては、同一または異なって、例えば置換数  
1~3の、ハロゲン、シアノ、ニトロ、ヒドロキシ、カルボキシ、カルバモイル、アミ  
ノ、モノまたはジ低級アルキルアミノ、シクロアルキル、低級アルカノイル、低級ア

ルコキシ、アリール、置換アリール、アリールオキシ、置換アリールオキシ、低級アルコキシカルボニル、低級アルカノイルオキシ等があげられる。

ここで示したハロゲン、モノもしくはジ低級アルキルアミノ、シクロアルキル、アリールおよびアリールオキシのアリール部分、ならびに低級アルコキシ、低級アルコキシカルボニル、低級アルカノイルおよび低級アルカノイルオキシの低級アルキル部分は、それぞれ前記ハロゲン(v)、モノまたはジ低級アルキルアミノ(iv)、シクロアルキル(ii)、アリール(vi)および低級アルキル(i)と同義である。

また、ここで示した置換アリールおよび置換アリールオキシにおける置換基としては、同一または異なって、例えば置換数 1~3 の、低級アルキル、低級アルコキシ、低級アルコキシカルボニル、ハロゲン、シアノ、ニトロ、ヒドロキシ、カルボキシ、アミノ等があげられる。

ここで示したハロゲンならびに低級アルキル、低級アルコキシおよび低級アルコキシカルボニルの低級アルキル部分は、それぞれ前記ハロゲン(v)および低級アルキル(i)と同義である。

(viii) 置換アリールおよび置換シクロアルキルにおける置換基としては、前記置換低級アルキルにおける置換基(vii)の定義であげた基に加え、例えば低級アルキル、置換低級アルキル等があげられる。

ここで示した置換低級アルキルにおける置換基としては、同一または異なって、例えば置換数 1~3 の、低級アルコキシ、低級アルコキシカルボニル、ハロゲン、シアノ、ニトロ、ヒドロキシ、カルボキシ、アミノ等があげられる。

ここで示したハロゲンならびに低級アルコキシおよび低級アルコキシカルボニルの低級アルキル部分は、それぞれ前記ハロゲン(v)および低級アルキル(i)と同義である。

また、ここで示した低級アルキルは、前記低級アルキル(i)と同義である。

ビスインドリルマレイミド誘導体、3-アリール-4-インドリルマレイミド誘導体、インドロカルバゾール誘導体、インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン誘導体、インジルピン誘導体、化合物(I)~(V)および化合物(Ia)~(IIla)の薬理学的に許容される塩としては、毒性のない水溶性のものが好ましく、例えば塩酸塩、硫酸塩、硝酸塩、リン酸塩などの無機酸塩、酢酸塩、マレイン酸塩、フマ

ル酸塩、クエン酸塩などの有機酸塩があげられ、薬理学的に許容される金属塩としては、ナトリウム塩、カリウム塩などのアルカリ金属塩、マグネシウム塩、カルシウム塩などのアルカリ土類金属塩、アルミニウム塩、亜鉛塩などがあげられ、薬理学的に許容されるアンモニウム塩としては、アンモニウム、テトラメチルアンモニウムなどの塩があげられ、薬理学的に許容される有機アミン付加塩としては、モルホリン、ピペリジンなどの付加塩等があげられる。

ビスインドリルマレイミド誘導体、3-アリール-4-インドリルマレイミド誘導体、インドロカルバゾール誘導体、インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン誘導体、インジルピン誘導体、化合物(I)～(V)および化合物(Ia)～(IIIa)は、EP 470490、WO 93/18766、WO 93/18765、EP 397060、WO 98/11105、WO 98/11103、WO 98/11102、WO 98/04552、WO 98/04551、DE 4243321、DE 4005970、DE 4217964、DE 4005970、DE 3914764、WO 96/04906、WO 95/07910、DE 42179464、US 5856517、US 5891901、WO 99/42100、EP 328026、EP 384349、EP 540956、DE 4005969、EP 508792、WO 99/65910、WO 01/037819 等に記載の方法またはそれらに準じた方法により製造することができる。

また、GSK-3の活性を阻害する物質として、short interference RNA (siRNA)を使用することもできる。GSK-3に対するsiRNAは、そのRNAi活性によりGSK-3の発現を抑制し、その結果、GSK-3の活性を阻害することができる。siRNAは、そのもの自身を細胞内に導入することによってGSK-3の活性を阻害することができるほか、siRNAを発現するベクターを細胞内に導入することによっても可能である。

ヒトGSK-3に対する効果的なsiRNAを作製するためには、効果の高いターゲット配列を選択することが重要である。その配列を決定するアルゴリズムは様々な方法が知られているが、例えば、ヒトGSK-3のメッセンジャーRNA配列中の任意の19配列の中で、グアニンまたはシトシンの含量が30～52%であること、3'末端の5塩基のうち3塩基以上がアデニンまたはウリジンであること、融解温度が20℃未満であること、3番目の塩基がアデニンであること、10番目の塩基がウリジンであること、13番目の塩基がグリシン以外であること、19番目の塩基がアデニンであること、19番目の塩基がグリシン及びシトシンでないことの各条件をより多

く満たす配列を選択することにより効果の高いターゲット配列を選択することができる。そのターゲット配列のオリゴRNAの3'末端に2塩基のヌクレオチドを付加したセンス鎖オリゴRNAおよびそのターゲット配列に相補的な配列のオリゴRNAの3'末端に2塩基のヌクレオチドを付加したアンチセンス鎖オリゴRNAの両者をハイブリダイズさせることにより、ヒトGSK-3に対する効果的な siRNA を作製することができる。siRNA の合成、精製、ハイブリダイズは様々な方法により可能であるが、例えば、*Silencer* siRNA Construction Kit (Ambion 社製) を用い、添付のプロトコールに従うことにより実施することができる。また siRNA を発現するベクターは、各種プラスミドベクターやレトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクターなどの各種ウイルスベクターによって可能であるが、例えば、piGENE hu6 Vector (iGENE 社製) に上記の方法により選択したターゲット配列のオリゴDNAを添付プロトコールに従って組み込むことにより作製することができる。siRNA や siRNA を発現するベクターの細胞内への導入は様々な方法により可能であるが、例えば Nucleofector Device (Amaxa 社製) を用い添付のプロトコールに従うことにより実施することができる。

## 2. GSK-3の活性を阻害する物質の探索法

GSK-3の活性を阻害する物質の探索法は、[i] 被験物質の存在下、GSK-3、GSK-3によりリン酸化されるペプチドおよびATPを共存させた場合と、[ii] 被験物質の非存在下、上記[i]のGSK-3、GSK-3によりリン酸化されるペプチドおよびATPを共存させた場合での、[iii] リン酸化されているペプチドの量を測定、比較し、[iv] 被験物質の非存在下に比べ、被験物質の存在下におけるリン酸化されているペプチドの量が少ない物質を選択する方法をあげることができる。

被験物質は、特に限定されないが、例えば、ペプチド、蛋白質、細胞抽出液や該抽出液由来の精製物、細胞培養上清や該上清由来の精製物、血清などの生体試料や該生体試料由来の精製物、微生物の菌体抽出液や該抽出液由来の精製物、微生物培養上清や該上清由来の精製物、化合物、コンビナトリアルケミストリーを用いて合成された化合物などをあげることができる。

GSK-3としては、GSK-3の活性を有するものであれば特に限定されない

が、好ましくはほ乳類、より好ましくはラット、マウス、サルまたはヒト由来の GSK-3  $\alpha$  または  $\beta$  をあげることができ、具体的には配列番号 1 で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質をあげることができる。

5 GSK-3 は、GSK-3 をコードする遺伝子を有する発現ベクターを動物細胞に導入し、該動物細胞を培養する方法などにより取得することができる。GSK-3 をコードする遺伝子は、GSK-3 をコードする遺伝子であれば特に限定されないが、好ましくはほ乳類、より好ましくはラット、マウス、サルまたはヒト由来の GSK-3  $\alpha$  または  $\beta$  をコードする遺伝子をあげることができ、具体的には配列番号 2 で表される塩基配列を有する遺伝子をあげることができる。

10 GSK-3 によりリン酸化されるペプチドとしては、グリコーゲン合成酵素をあげることができ、グリコーゲン合成酵素としては、例えば配列番号 3 で表されるアミノ酸配列を有するペプチドをあげることができる。

グリコーゲン合成酵素は、グリコーゲン合成酵素をコードする遺伝子を有する発現ベクターを動物細胞に導入し、該動物細胞を培養する方法などにより取得することができる。グリコーゲン合成酵素をコードする遺伝子は、グリコーゲン合成酵素をコードする遺伝子であれば特に限定されないが、好ましくはほ乳類、より好ましくはラット、マウス、サルまたはヒト由来のグリコーゲン合成酵素をコードする遺伝子をあげることができ、具体的には配列番号 4 で表される塩基配列を有する遺伝子をあげることができる。

20 また、蛋白質の翻訳に関与する eukaryotic initiation factor 2B (eIF2B) 蛋白質のアミノ酸配列中で、GSK-3 によりリン酸化される部位を含むアミノ酸配列を有するペプチドも GSK-3 によりリン酸化されるペプチドとして用いることができ、具体的には配列番号 5 で表されるアミノ酸配列を有するペプチドをあげることができる。

25 GSK-3 の活性を測定する方法としては、例えばリン酸の供与体である ATP として [ $\gamma$ - $^{33}\text{P}$ ] ATP を用い、被験物質存在下、または被験物質非存在下において、GSK-3 によるグリコーゲン合成酵素または該酵素のリン酸化部位を含むペプチドのリン酸化反応を行い、該酵素またはペプチドに取り込まれた  $^{33}\text{P}$  の量を液体シンチレーションカウンターなどを用いて測定する方法をあげることができ

る。

### 3. 神経再生薬

神経再生薬とは、ヒトまたは動物の脳内の神経幹細胞に直接作用することでニューロン新生を促進し、脳内のニューロンを増加させる作用を有する薬剤をいう。

- 5     該神経再生薬は、神経の変性または損傷を伴う神経疾患の治療薬として用いることができる。

該神経疾患としては、パーキンソン病、アルツハイマー病、ダウン症、脳血管障害、脳卒中、脊髄損傷、ハンチントン舞踏病、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症、てんかん、不安障害、統合失調症、うつ病および躁鬱病などをあげることができる。

- 10     GSK-3の活性を阻害する物質またはその薬理学的に許容される塩は、神経再生薬として、そのまま単独で投与することも可能であるが、通常各種の医薬製剤として提供するのが望ましい。また、それら医薬製剤は、動物および人に使用されるものである。

- 15     本発明の神経再生薬は、活性成分としてGSK-3の活性を阻害する物質またはその薬理学的に許容される塩を単独で、または任意の他の治療のための有効成分との混合物として含有することができる。また、それら医薬製剤は、活性成分を薬理学的に許容される一種またはそれ以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野においてよく知られている任意の方法により製造される。

- 20     投与経路は、治療に際し最も効果的なものを使用するのが望ましく、経口または、例えば静脈内などの非経口をあげることができる。

投与形態としては、錠剤、散剤、顆粒剤、シロップ剤、注射剤などがある。

- 25     経口投与に適当な、例えばシロップ剤のような液体調製物は、水、蔗糖、ソルビット、果糖などの糖類、ポリエチレングリコール、プロピレングリコールなどのグリコール類、ごま油、オリーブ油、大豆油などの油類、p-ヒドロキシ安息香酸エステル類などの防腐剤、ストロベリーフレーバー、ペパーミントなどのフレーバー類などを使用して製造できる。また、錠剤、散剤および顆粒剤などは、乳糖、ブドウ糖、蔗糖、マンニットなどの賦形剤、澱粉、アルギン酸ソーダなどの崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、タルクなどの滑沢剤、ポリビニールアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチンなどの結合剤、脂肪酸エステルなどの界面活性

剤、グリセリンなどの可塑剤などを用いて製造できる。

非経口投与に適当な製剤は、好ましくは受容者の血液と等張である活性化合物を含む滅菌水性剤からなる。例えば、注射剤の場合は、塩溶液、ブドウ糖溶液または塩水とブドウ糖溶液の混合物からなる担体などを用いて注射用の溶液を調製する。

- 5      また、これら非経口剤においても、経口剤で例示した希釈剤、防腐剤、フレーバー類、賦形剤、崩壊剤、滑沢剤、結合剤、界面活性剤、可塑剤などから選択される1種もしくはそれ以上の補助成分を添加することもできる。

- 10      GSK-3の活性を阻害する物質またはその薬理学的に許容される塩の投与量および投与回数は、投与形態、患者の年齢、体重、治療すべき症状の性質または重篤度により異なるが、通常経口の場合、成人一人当たり0.01mg~1g、好ましくは0.05~50mgを一日一回ないし数回投与する。静脈内投与などの非経口投与の場合、成人一人当たり0.001~100mg、好ましくは0.01~10mgを一日一回ないし数回投与する。

#### 4. 神経幹細胞のニューロン新生促進剤

- 15      神経幹細胞のニューロン新生促進剤とは、*in vivo* または *in vitro* において、神経幹細胞と接触させたとき、該神経幹細胞のニューロン新生を促進する薬剤のことをいう。

神経幹細胞は、神経幹細胞であれば特に限定されないが、脳の成体神経幹細胞が好ましい。

- 20      脳は、いずれの動物の脳であってもよいが、好ましくは哺乳動物、より好ましくはラット、マウス、サル、ヒトなどの脳をあげることができる。

GSK-3の活性を阻害する物質またはその薬理学的に許容される塩は、神経幹細胞のニューロン新生促進剤として、そのまま単独で用いることも可能であるが、通常各種の医薬製剤として提供するのが望ましい。また、それら医薬製剤は、動物および人に使用されるものである。

- 25      本発明の神経幹細胞のニューロン新生促進剤は、活性成分としてGSK-3の活性を阻害する物質またはその薬理学的に許容される塩を単独で、または任意の他の治療のための有効成分との混合物として含有することができる。それら医薬製剤は、上記した神経再生薬の製剤と同様の方法により製造することができ、同様の投与方法により投与することができる。

本発明の神経幹細胞のニューロン新生促進剤は、*in vitro*において、神経幹細胞と接触させ、該神経細胞を培養することにより、ニューロンを新生させ、培養物から該ニューロンを採取することを特徴とするニューロンの製造法に用いることができる。*in vitro*で本発明の神経幹細胞のニューロン新生促進剤を用いる場合、GSK-3の活性を阻害する物質またはその薬理学的に許容される塩を、該物質または該塩を溶解することができる溶液に溶解して用いることが好ましい。該溶液としては、水、DMSOなどをあげることができる。

5 5. 本発明のニューロン新生促進剤の存在下、神経幹細胞を培養して得られるニューロン

10 本発明のニューロン新生促進剤の存在下、動物の神経幹細胞を培養することにより、該神経幹細胞のニューロン新生を積極的に促進させることができる。動物の神経幹細胞は、いずれの動物の神経幹細胞であってもよく、好ましくは哺乳動物、より好ましくはラット、マウス、サル、ヒト由来の神経幹細胞をあげることができ、神経幹細胞としては、脳由来の神経幹細胞をあげることができる。神経幹細胞は、  
15 いずれの週齢、または年齢の動物由来の細胞でもよいが、好ましくは成体神経幹細胞をあげることができる。

動物から成体神経幹細胞を取得する方法としては、J. Neurosci., 19, 8487 (1999)およびGenes & Develop., 10, 3129 (1996)記載の方法に準じて、外科的手法によって成体動物から脳を摘出して、脳細胞粗抽出液を調製し、該粗抽出液から  
20 成体幹細胞を濃縮する方法をあげることができる。

また、ヒトから成体神経幹細胞を取得する方法としては、Experimental Cell Research, 289, 378 (2003)記載の方法に準じて、バイオプシーによって神経疾患患者の側脳室壁から組織を採取して、脳細胞粗抽出液を調製し、該抽出液から成体幹細胞を濃縮する方法をあげることができる。

25 本発明のニューロン新生促進剤存在下、成体神経幹細胞を培養する場合、 $1.8 \times 10^5$ 個/cm<sup>2</sup>程度の成体神経幹細胞に対して、該ニューロン新生促進剤を100nmol/l～100μmol/lの濃度で作用させることが好ましい。ただし、リチウムまたはその薬理学的に許容される塩は100μmol/l～10mmol/lの濃度で作用させることが好ましい。成体神経幹細胞と本発明のニューロン新生促進剤を接触させ、37℃で5%CO



2 雰囲気下、4～14 日間、2 日おきに全量または部分量培地交換しながら静置培養することでニューロン新生を促進させることができる。

成体神経幹細胞の培養に用いる培地は、ニューロン新生の促進を妨げない培地であればいずれの培地でもよいが、1%の N2 supplement (Invitrogen 社製) を含む  
5 DMEM/F12 培地 (Invitrogen 社製) などを用いるのが好ましい。

上記の培養により取得されるニューロンは、培地から回収し、神経疾患患者の障害部位へ外科的手法で移植することにより該神経疾患の治療に用いることができる。該神経疾患としては、パーキンソン病、アルツハイマー病、ダウン症、脳血管障害、脳卒中、脊髄損傷、ハンチントン舞踏病、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化  
10 症、てんかん、不安障害、統合失調症、うつ病および躁鬱病などをあげることができる。

#### 6. 本発明の神経再生薬の評価法

本発明の神経再生薬が、in vivo においてニューロンを再生させ、神経疾患を治療することができることは、以下の方法により確認することができる。

15 上記した本発明の神経再生薬を、ラットまたはサルなどの実験動物に投与する。実験動物は、傷害を有していない健康な動物であってもよいが、海馬虚血傷害を与えることによりニューロン新生を効果的に観察することができるので [Cell, 110, 429 (2002)]、虚血、6-hydroxydopamine (6-OHDA) 投与またはカイニン酸投与等の方法により、脳に傷害を与えた動物が好ましい。投与経路としては、経口、口腔内、  
20 皮下、筋肉内、静脈内または脳室内などへの投与をあげることができる。投与量、投与方法としては、例えば体重 1kg 当り 100  $\mu$ g～10mg、好ましくは 500  $\mu$ g～500ng を一日一回ないし数回投与する。静脈内投与などの非経口投与の場合、体重 1kg 当り 10  $\mu$ g～1mg、好ましくは 100  $\mu$ g～100ng を一日一回ないし数回投与する。

新生したニューロンは以下の方法により検出することができる。

25 増殖細胞を標識することができるプロモデオキシウリジン (BrdU)、または Green Fluorescent Protein (GFP) やベータガラクトシダーゼ等の細胞標識可能な遺伝子を発現できるレトロウイルスベクターを該物質の最初の投与と同時、投与前または投与後に該実験動物に投与した後、該物質を一日一回ないし数回投与して 10～20 日間飼育する。その後、該実験動物の脳を摘出し、脳の凍結切片を調製して蛍光顕微

鏡を用いて観察し、例えば増殖細胞を標識する薬剤として BrdU を用いた場合は、単位面積当たりの BrdU 陽性細胞数および BrdU 陽性細胞数に対するニューロンマーカーである Tuj1 陽性細胞数の割合を、陰性コントロールと比較する。

5 以上の方法により、本発明の神経再生薬のニューロン新生促進作用および神経疾患治療効果を評価することができる。

#### 7. 本発明のニューロン新生促進剤の評価法

参考例 2 記載の方法で取得できる ANSC-7 細胞を、1ml の 1% の N2 supplement (Invitrogen 社製) と 20 ng/ml の FGF-2 (PeproTech 社製) を含む DMEM/F12 培地が入ったポリオルニチンおよびラミニンでコートした 12 穴培養ディッシュに  
10 1 穴当たり  $1.8 \times 10^5$  個まき、一晩インキュベートする。培養液を、FGF2 を含まず 0.5% の胎仔牛血清及び 1% の N2 supplement を含む DMEM/F12 培地 (Invitrogen 社製。以下、分化誘導培地と称する) に全量交換して分化を誘導する。その際、PBS (Invitrogen 社製) または DMSO で 0.01mmol/l ~ 5mol/l の範囲で段階的に希釈した GSK-3 の活性を阻害する物質をそれぞれ 1000 分の 1 容量添加する。陰性  
15 コントロールとして同容量の PBS または DMSO を添加する。

培養液を、それぞれの GSK-3 の活性を阻害する物質が入った分化誘導培地で 2 日おきに交換し、計 6 日間分化誘導後、15% 中性緩衝ホルマリン液 (和光純薬工業) に置換し 20 分間固定する。その後、0.3% TritonX-100 (ナカライテスク社製) を含む PBS を用いた 5 分間の洗浄を 3 回繰り返す。次に、PBS で希釈した 10% ヤギ  
20 胎児血清 (DAKO 社製) を用いて細胞を 2 時間ブロッキングした後、1 次抗体として PBS で 1000 倍希釈したマウス抗 Tuj1 ( $\beta$  チューブリンイソタイプ III) 抗体 (シグマ アルドリッチ社製) を 4℃ で 16 時間反応させる。その後、0.3% TritonX-100 を含む PBS を用いた 5 分間の洗浄を 3 回繰り返す。

次に、2 次抗体として 1000 倍希釈した Alexa Fluor 488 コンジュゲートヤギ抗マ  
25 ウス IgG 抗体 (Molecular Probes 社製) を室温で 2 時間反応させる。同時に Bisbenzimidazole H 33342 Fluorochrome, Trihydrochloride (Calbiochem 社製、以下 H33342 と記す) を終濃度  $1 \mu\text{g/ml}$  になるように添加し、核を染色する。PBS に浸したのち倒立型蛍光顕微鏡 (ニコン社製) により観察し、2.44 平方ミリメートルあたりの Tuj1 陽性ニューロン数をカウントする。

以下、本発明のニューロン新生促進剤のニューロン新生促進作用に関する実験例を示す。

#### 実験例 1：塩化リチウムによるニューロン新生促進（1）

上記 7 の方法により、ANSC-7 細胞の分化誘導時に PBS で 0.01, 0.1, 1, 3mmol/l になるように溶解した塩化リチウムまたは塩化ナトリウム（いずれもナカライテスク社製）を培養液の 1000 分の 1 容量、ANSC-7 細胞を含有する培地に添加し、分化誘導後 6 日目のニューロン数を解析した。その結果、Tuj1 陽性のニューロン数は終濃度 0.01, 0.1, 1, 3mmol/l の塩化リチウムでそれぞれ 1.1, 1.3, 1.8, 2.1 倍となり（塩化リチウム 1mmol/l 以上で有意差あり）、塩化リチウム濃度に依存して増加した。また 3mmol/l の塩化リチウムによる H33342 陽性の総細胞数は塩化リチウムなしのコントロールと比較して 1.1 倍で有意差がなかった。以上のことから、塩化リチウムは ANSC-7 細胞のニューロン新生促進作用を有することが明らかとなった。また、ネガティブコントロールである塩化ナトリウムでは Tuj1 陽性のニューロン数は終濃度 0.01, 0.1, 1, 3mmol/l でそれぞれ 1.0, 1.1, 1.2, 1.2 倍で全て有意差は無く、ニューロン新生数の増加は塩濃度や塩化物イオンによる効果ではなくリチウムの効果であると考えられる。

#### 実験例 2：塩化リチウムによるニューロン新生促進（2）

ANSC-7 細胞に対するニューロン新生促進作用が BDNF および Bcl-2 の発現誘導によるものであるかどうかを明らかにするため、リチウムにより BDNF および Bcl-2 の発現が促進されるか否かを半定量的 RT-PCR により解析した。

ANSC-7 細胞を、2ml の 1%の N2 supplement と 20 ng/ml の FGF-2 を含む DMEM/F12 培地が入ったポリオルニチンとラミニンでコートした 6 穴培養ディッシュに、1 穴あたり  $4.5 \times 10^5$  個になるように計 7 穴まき、一晩インキュベートした。1 穴の細胞から RNeasy mini kit (キアゲン社製) を用いて添付プロトコールに従って全 RNA を取得した。残り 6 穴の培地を分化誘導培地に全量交換して分化を誘導した。そのうち 2 穴には 3mmol/l の塩化リチウムを培地の 1000 分の 1 容量、別の 2 穴には 1mmol/l の塩化リチウムを培地の 1000 分の 1 容量添加した。残り 2 穴には同容量の PBS を添加しコントロールとした。

分化誘導開始から 24 時間後、各濃度の塩化リチウムを添加した 1 穴ずつから細

胞を採取し、該細胞から上記と同様の方法により全 RNA を取得し、残りの細胞からは分化誘導開始から 6 日後に全 RNA を取得した。上記で取得した各 5  $\mu$ g の全 RNA に、10  $\mu$ l の 5 $\times$ DNase buffer、0.5  $\mu$ l の RNase inhibitor (40U/ $\mu$ l)、2.5  $\mu$ l の RNase-free DNaseI (1U/ $\mu$ l) (以上プロメガ社製) をそれぞれ加え、滅菌水で総容  
5 量を 50  $\mu$ l とした。37 $^{\circ}$ C で 30 分間反応させた後、フェノール/クロロホルム処理したのちエタノール沈殿した。

DNase 処理した各 1  $\mu$ g の全 RNA に 0.5  $\mu$ g/ $\mu$ l オリゴ(dT)12-18 プライマーを 1  $\mu$ l 加え、滅菌水で総容量を 12  $\mu$ l とした。65 $^{\circ}$ C で 10 分間加熱した後氷上で急冷し、4  $\mu$ l の 5 $\times$ synthesis buffer (インビトロジェン社製)、1  $\mu$ l の 10mmol/l dNTP mix、  
10 2  $\mu$ l の 0.1mol/l DTT、1  $\mu$ l の 200U/ $\mu$ l Superscript II RT (インビトロジェン社製) を加え、42 $^{\circ}$ C で 50 分間反応した。90 $^{\circ}$ C で 5 分間加熱した後氷上に 10 分間置いた。

次に RNaseH (2U/ $\mu$ l) (インビトロジェン社製) を 1  $\mu$ l 加え、37 $^{\circ}$ C で 20 分間反応し、滅菌水を加えて総容量を 200  $\mu$ l とすることにより cDNA を作製した。

同様に陽性コントロール用としてラット脳的全 RNA から cDNA を作成した。1  $\mu$ l  
15 の該 cDNA に、2  $\mu$ l の 10  $\mu$ mol/l プライマーセット、1  $\mu$ l の DMSO (ナカライテスク社製)、2  $\mu$ l の 10 $\times$ ExTaq buffer、1.6  $\mu$ l の dNTPmix、0.1  $\mu$ l の ExTaq (以上、タカラバイオ社製) を加え、サーマルサイクラーを用いて 94 $^{\circ}$ C で 1 分間処理後、94 $^{\circ}$ C で 1 分間、60 $^{\circ}$ C で 1 分間、74 $^{\circ}$ C で 1 分間のサイクルを、Bcl-2 増幅用 PCR で 27 サイクル、BDNF 増幅用 PCR で 35 サイクル繰り返し、それぞれの cDNA 断片を増幅させた。  
20 Bcl-2 の増幅には配列番号 6 および 7 で表される塩基配列からなる合成 DNA を、BDNF の増幅には配列番号 8 および 9 で表される塩基配列からなる合成 DNA をプライマーセットに用いた。

増幅 DNA は、1.8% アガロース (ナカライテスク社製) ゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイド (ナカライテスク社製) で染色後、トランスイルミネーター (東  
25 洋紡社製) で検出した。Bcl-2 のバンド強度は分化開始後 24 時間目および 6 日目ともに塩化リチウムの濃度差により変化しなかった。BDNF は塩化リチウムの濃度差に関わらず発現は認められなかった。

以上の結果から、塩化リチウムによるニューロン新生促進活性は、Bcl-2 および BDNF を介した細胞死抑制の結果ではなく、塩化リチウムは積極的にニューロン新生

を促進することが示唆された。

### 実験例 3：塩化リチウムによるニューロン新生促進（3）

リチウムによるニューロン新生促進作用がアポトーシス抑制による新生細胞数の増加によるものであるのか、または積極的にニューロン分化を誘導していること  
5 によるものであるのかを明らかにするため、リチウムによる ANSC-7 細胞に対するアポトーシス抑制効果を解析した。

上記 7 の方法により、塩化リチウムを終濃度 3mmol/l になるように ANSC-7 細胞を含有する培地に添加して 6 日間培養し、塩化リチウムを添加して培養した ANSC-7 細胞とコントロールとして PBS を添加して培養した ANSC-7 細胞とを、*in situ* 細胞  
10 死検出キット、フルオレセイン（ロシュ・ダイアグノスティックス社製）を用いて添付プロトコルどおり該細胞と反応させた。倒立型蛍光顕微鏡（ニコン社製）を用いて該細胞を観察し、2.44 平方ミリメートルあたりのアポトーシス細胞数をカウントした。

その結果、アポトーシス陽性細胞数は塩化リチウム添加により 1.0 倍となり変化  
15 せず、塩化リチウムは ANSC-7 細胞のアポトーシスを抑制しないことが明らかとなった。従って、リチウムによるニューロン新生促進作用は、積極的なニューロン新生の促進によるものであることが明らかとなった。

### 実験例 4：インスリンおよびフォルスコリンとリチウムとのニューロン新生促進作用に関する拮抗作用

ニューロン新生促進作用が知られるインスリンおよびフォルスコリンとリチウムとのニューロン新生促進作用に関する拮抗作用を解析した。  
20

上記 7 の方法により、ANSC-7 細胞の分化誘導時に、培地中の濃度が 5  $\mu$ g/ml または 25  $\mu$ g/ml になるようにインスリンを培地に添加するとともに、各濃度のインスリンを含む培地に、終濃度が 0、1 および 3mmol/l になるように塩化リチウムを  
25 添加し、6 日間分化誘導を行った。

その結果、3mmol/l の塩化リチウムによるニューロン増加率は、5  $\mu$ g/ml のインスリン共存時に比べ、25  $\mu$ g/ml のインスリン共存時で 0.70 倍となり有意に低下していた。よって、インスリンとリチウムの作用が拮抗することが明らかとなった。

また、上記と同様の方法にて、インスリンの代わりに終濃度が 0、1 および 5  $\mu$

mol/l になるようにフォルスコリンを培地に添加し、終濃度が 0 または 3mmol/l の塩化リチウム共存時におけるニューロン増加率を算出した。

その結果、塩化リチウムなしの条件ではフォルスコリンによるニューロン増加率が 1, 5  $\mu$ mol/l のフォルスコリンでそれぞれ 1.9, 2.2 倍であるのに対し、3mmol/l の塩化リチウム共存時にはそれぞれ 1.2, 1.1 倍と加算しなかった。従って、塩化リチウムとフォルスコリンは、ニューロン新生促進作用において拮抗することが明らかとなった。

リチウムの標的分子としては、GSK-3 やイノシトール-1-リン酸フォスファターゼやイノシトール-ポリフォスファターゼが知られており [Nature, 417, 292-295 (2002)]、また、インスリンとフォルスコリンは間接的に GSK-3 の活性を阻害することが知られている [Mol. Cell. Biol., 19, 4989-5000 (1999)]。リチウム、インスリンおよびフォルスコリンのニューロン新生促進作用に関する標的分子は共通であると考えられることから、リチウムは GSK-3 の活性を阻害することにより神経幹細胞のニューロン新生を促進していることが示された。

実験例 5 : GSK-3 の選択的阻害剤である SB-216763 によるニューロン新生促進  
参考例 1 記載の方法により合成した GSK-3 の選択的阻害剤として知られる SB-216763 [Chem. Biol., 7, 793-803 (2000)] を、0.1 および 0.33mmol/l になるように DMSO に溶解し、上記 7 の方法により、その 1000 分の 3 容量を ANSC-7 を含有する培地に、ANSC-7 細胞分化誘導時に添加し、分化誘導後 6 日目のニューロン数を測定した。

その結果、Tuj1 陽性のニューロン数は終濃度 0.3, 1.0  $\mu$ mol/l の SB-216763 によってそれぞれ 1.2 倍、1.8 倍となり濃度依存的に有意に増加した。よって、GSK-3 を選択的に阻害する活性を持つ化合物によりニューロン新生を促進できることが明らかとなった。

以上より、GSK-3 を選択的に阻害する活性を持つ物質は、神経幹細胞のニューロン新生促進剤になるとともに、神経の再生治療薬になることが示された。

実験例 6 : GSK-3 の阻害剤である 9-プロモ-7,12-ジヒドロ-インドロ [3,2-d] [1] ベンズアゼピン-6 (5H)-オン (Kenpaullone) によるニューロン新生促進  
実験例 1 に示した方法と同様の方法により、GSK-3 およびサイクリン依存性

- キナーゼ(以下、CDKと称す)の阻害剤として知られる Kenpaullone [Biochem. J., 371, 199-204 (2003)、CALBIOCHEM 社製] を、0.5、2 および 5mmol/l になるように DMSO に溶解し、培養液の 1000 分の 1 容量の該 DMSO 溶液を、ANSC-7 細胞を含有する培地に添加し、分化誘導後 6 日目の Tuj1 陽性ニューロン数を解析した。陰性コントロールとして同容量の DMSO を添加した。また同様に、CDK阻害剤として知られ、GSK-3 はほとんど阻害しない Roscovitine [Biochem. J., 371, 199-204 (2003)、シグマアルドリッチ社製] を、2、5 および 10mmol/l になるように DMSO に溶解し、培養液の 1000 分の 1 容量の該 DMSO 溶液を、ANSC-7 細胞を含有する培地に添加し、分化誘導後 6 日目の Tuj1 陽性ニューロン数を解析した。
- 10     その結果、Tuj1 陽性ニューロン数は終濃度 0.5  $\mu\text{mol/l}$  の Kenpaullone で陰性コントロールと比較して 1.3 倍、2  $\mu\text{mol/l}$  で 2.7 倍、5  $\mu\text{mol/l}$  で 3.7 倍となり、Kenpaullone の濃度依存的に有意に増加した。一方、終濃度 2  $\mu\text{mol/l}$  の Roscovitine で陰性コントロールと比較して 1.0 倍、5  $\mu\text{mol/l}$  で 1.2 倍、10  $\mu\text{mol/l}$  で 1.1 倍でありそれぞれ有意差は無く、Roscovitine による Tuj1 ニューロン数の増加は認められなかった。従って、Kenpaullone はニューロン新生促進作用を持ち、その作用は Kenpaullone の CDK阻害活性ではなく GSK-3 阻害活性によるものであることが明らかとなった。
- 15

- 以上より、リチウム、SB-216763 に限らず、GSK-3 を阻害する活性を持つ化合物は、神経幹細胞のニューロン新生促進剤になるとともに、神経疾患の再生治療用医薬になることが示された。
- 20

#### 実験例 7 : GSK-3 $\beta$ 遺伝子高発現によるニューロン新生の抑制

- アルツハイマー病患者の脳内で GSK-3  $\beta$  の高発現が認められることから [J. Neuropathol. Exp. Neurol., 56, 70-78 (1997)]、アルツハイマー病発症の原因と GSK-3  $\beta$  の関係を明らかにするため、成体神経幹細胞のニューロン分化に対する GSK-3  $\beta$  高発現の影響を、レトロウイルスベクターを用いて検討した。
- 25

まず、実験例 2 に記載したラット脳由来 cDNA を鋳型として、野生型ラット GSK-3  $\beta$  遺伝子をコードする cDNA を以下のように調製した。2.5  $\mu\text{l}$  の鋳型 cDNA に、3  $\mu\text{l}$  の配列番号 10 および 1.1 からなる 10  $\mu\text{mol/l}$  のプライマーセット (プロリゴ社製)、5  $\mu\text{l}$  の 10 $\times$ PCR buffer for KOD-plus-、5  $\mu\text{l}$  の 2mmol/l dNTPs、

2  $\mu$ l の 25mmol/l  $\text{MgSO}_4$ 、1  $\mu$ l の KOD -plus- DNA polymerase.(以上、東洋紡績社製) および 31.5  $\mu$ l の滅菌水を加え、サーマルサイクラーを用いて 94℃で 2 分間保温後、94℃で 15 秒間、60℃で 30 秒間、68℃で 1 分 20 秒間のサイクルを 25 サイクル繰り返し、cDNA 断片を増幅させた。

5 一方、GSK-3 $\beta$  のキナーゼ活性を失う変異である 85 番目のリジン残基がアルギニン残基に変異した変異型ラット GSK-3 $\beta$  遺伝子 [Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 92, 8498-8502 (1995)] をコードする cDNA を同様に以下のように調製した。

2.5  $\mu$ l の野生型ラット GSK-3 $\beta$  遺伝子をコードする cDNA を鋳型として、配列番号 10 および 12 からなるプライマーセットを用いて変異型ラット GSK-3 $\beta$  の 5' 末端側部分長 cDNA を増幅させ、配列番号 11 および 13 からなるプライマーセットを用いて変異型ラット GSK-3 $\beta$  の 3' 末端側部分長 cDNA を増幅させた。それぞれの部分長 cDNA の混合物を鋳型として、配列番号 10 および 11 からなるプライマーセットを用いて変異型ラット GSK-3 $\beta$  の完全長 cDNA を増幅させた。

15 野生型および変異型それぞれの増幅反応液をフェノール/クロロホルム処理したのちエタノールを加えて沈殿させ、QIAquick PCR purification kit (キアゲン社製) で添付プロトコールに従って精製した。

続いて 10  $\mu$ g の pCLNCX プラスミドベクター (IMGENEX 社製) に 10  $\mu$ l の 10 $\times$ M バッファー、5  $\mu$ l の HindIII (タカラバイオ社製) を加え、滅菌水を加えて 100  $\mu$ l とし、37℃で 12 時間反応させた。反応液をフェノール/クロロホルム処理した後エタノールを加えて DNA を沈殿させ、32  $\mu$ l の滅菌水に溶解した。該 DNA 溶液に 4  $\mu$ l の 10 $\times$ Blunting buffer、4  $\mu$ l の KOD DNA polymerase を加え、72℃で 2 分間反応させ平滑末端化した。反応液をフェノール/クロロホルム処理した後エタノールを加えて DNA を沈殿させ、43  $\mu$ l の滅菌水に溶解した後、5  $\mu$ l の 10 $\times$  Alkaline Phosphatase buffer および 2  $\mu$ l の Alkaline Phosphatase (以上、タカラバイオ社製) を加え 65℃で 30 分間反応させた。反応液をフェノール/クロロホルム処理したのちエタノールを加えて DNA を沈殿させ滅菌水に溶解した。

この切断した pCLNCX プラスミドベクター 3  $\mu$ g に上記で調製した 3  $\mu$ g の野生型または変異型のラット GSK-3 $\beta$  遺伝子をコードする cDNA を混合し滅菌水を



加えて  $4\mu\text{l}$  とし、 $4\mu\text{l}$  の ligation high (東洋紡績社製) を加え  $16^{\circ}\text{C}$  で 12 時間反応させた。これを *E. coli* DH5  $\alpha$  コンピテントセル (タカラバイオ社製) にトランスフォーメーションした。定法によりアンピシリン耐性コロニーを液体 LB 培地で培養し、Endofree Plasmid Maxi Kit (キアゲン社製) を用いて添付プロトコールに従って pCLNC-GSK3  $\beta$  プラスミド DNA および pCLNC-GSK3  $\beta$  (K85R) プラスミド DNA を調製した。

次に、以下のとおりウイルスベクターを作製し、ANSC-7 細胞のニューロン分化に関わる機能を解析した。まず、pCLNC-GSK3  $\beta$ 、pCLNC-GSK3  $\beta$  (K85R)、または陰性コントロールである pCLNCX プラスミドベクター DNA  $15\mu\text{g}$  と、それぞれ pMD.G プラスミドベクター DNA (米国ソーグ研究所より分与)  $5\mu\text{g}$  を 2ml の D-MEM high glucose 培地 (インビトロジェン社製) に溶解し、Transfast transfection reagent (プロメガ社製) を用いて添付プロトコールに従って、前日に用意した 293gp 細胞 (米国ソーグ研究所より分与) にトランスフェクションを行った。

トランスフェクションの 3 日後に、培養上清を  $0.45\mu\text{m}$  のフィルター (Millipore 社製) でろ過し、ウイルスベクターを含む溶液を回収した。該ウイルスベクター溶液をポリアロマチューブ (日立工機製) に移し、超遠心機 (日立工機製) を用いて  $50,000\times g$ 、 $18^{\circ}\text{C}$  で 90 分間遠心分離した。上清を除去し、沈殿しているウイルスを 1% の N2 supplement と 20 ng/ml の FGF-2 と  $8\mu\text{g/ml}$  の臭化ヘキサジメトリン (シグマアルドリッチ社製) を含む DMEM/F12 培地に懸濁した。実験例 1 に示した方法と同様の方法により、ポリオルニチンおよびラミニンでコートした 12 穴培養ディッシュに 1 穴当たり  $1.8\times 10^5$  個まいて一晩静置した ANSC-7 細胞から培養上清を除いて該ウイルス懸濁液を添加し、 $37^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  濃度のインキュベーター中で 2 時間培養して感染させた。続いて培養液を分化誘導培地に全量交換して分化誘導を開始し、実験例 1 と同様に分化誘導 6 日後の Tuj1 陽性ニューロン数を解析した。

その結果、陰性コントロールである pCLNCX より作製したレトロウイルスを感染させ分化させた ANSC-7 細胞と比べ、pCLNC-GSK3  $\beta$  より作製したレトロウイルスを感染させ GSK-3  $\beta$  を高発現させ分化させた細胞では新生ニューロン数が 33% 有意に減少した。一方、pCLNC-GSK3  $\beta$  (K85R) より作製したレトロウイルスを感染させキナーゼ活性を持たない GSK-3  $\beta$  (K85R) を高発現させ分化させた細胞

では新生ニューロン数が野生型 GSK-3 $\beta$  を高発現させた細胞より有意に 34%多く、陰性コントロールである pCLNCX より作製したレトロウイルスを感染させ分化させた場合と同程度であった。よって GSK-3 $\beta$  のキナーゼ活性によりニューロン新生が抑制されることが明らかとなった。

- 5 従って、アルツハイマー病は、GSK-3 $\beta$  の高発現による標的分子のリン酸化の促進によってニューロン新生が抑制されることにより脳の自己再生能が抑制され、発症する可能性が示され、GSK-3 阻害剤が神経疾患、例えばアルツハイマー病の治療薬となり得ることが示された。

実験例 8 : 会合型ベータアミロイドペプチドによるニューロン新生の抑制と GSK

- 10 -3 阻害剤による抑制の解除 (1)

- ベータアミロイドペプチド (以下、A $\beta$  と称す) は老人斑の主要構成成分であり、アルツハイマー病の原因であると考えられている物質である [Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 98, 11039-11041 (2001)]。A $\beta$  [1-40] (BIOSOURCE 社製) を 0.1% (v/v) トリフルオロ酢酸 (ナカライテスク社製) で 10mg/ml になるように溶解し、  
15 25℃で 1 時間保温した後、PBS で 0.5mg/ml に希釈した。25℃で 24 時間保温して会合体を形成させ [J. Biol. Chem., 276, 42027-42034 (2001)]、実験例 1 に示した方法と同様の方法により ANSC-7 細胞の分化誘導時に終濃度 0.1mg/ml になるように培地に添加し、陰性コントロールには同容量の PBS を添加した。分化誘導 2 日後、4 日後にはそれぞれ分化誘導培地のみで全量培地交換し、分化誘導 6 日後のニューロン  
20 数を測定した。

その結果、Tuj1 陽性ニューロン数は会合型 A $\beta$  の添加により 78% 有意に減少した。従って、神経疾患の 1 つであるアルツハイマー病は、会合型 A $\beta$  によりニューロン新生が抑制されることにより、脳の自己再生能が抑制され、発症する可能性が示された。

- 25 実験例 9 : 会合型ベータアミロイドペプチドによるニューロン新生の抑制と GSK-3 阻害剤による抑制の解除 (2)

会合型 A $\beta$  によるニューロン新生の抑制がアポトーシス促進による新生細胞数の減少によるものであるのか、またはニューロン分化の抑制によるものであるのかを明らかにするため、会合型 A $\beta$  の ANSC-7 細胞に対するアポトーシス促進効果を

解析した。

実験例 8 と同様の方法により、終濃度 0.1mg/ml の会合型 A $\beta$  を含有する分化誘導培地により 6 日間分化誘導した ANSC-7 細胞とコントロールとして PBS を含有する分化誘導培地により分化誘導した ANSC-7 細胞とを、*insitu* 細胞死検出キット、  
5 フルオレセイン（ロシュ・ダイアグノスティックス社製）を用いて添付プロトコールどおり該細胞と反応させた。倒立型蛍光顕微鏡（ニコン社製）を用いて該細胞を観察し、2.44 平方ミリメートルあたりのアポトーシス細胞数をカウントした。

その結果、アポトーシス陽性細胞数は会合型 A $\beta$  添加により 14% 増加したが有意差は無かったことから、会合型 A $\beta$  による新生ニューロン数の減少は、アポト  
10 ーシス促進よりもニューロン分化の抑制により主に引き起こされることが明らかとなった。

実験例 10 : 会合型ベータアミロイドペプチドによるニューロン新生の抑制と GSK-3 阻害剤による抑制の解除 (3)

実験例 8 と同様の方法により、終濃度 0.1mg/ml の会合型 A $\beta$  を含有する分化誘導培地で ANSC-7 細胞を分化誘導する際に、塩化リチウムを終濃度 3mmol/l、または Kenpaullone を終濃度 2 $\mu$ mol/l になるように加え、分化誘導 6 日後の TuJ1 陽性  
15 ニューロン数を解析した。

その結果、塩化リチウムまたは Kenpaullone を加えることにより、TuJ1 陽性ニューロン数が、会合型 A $\beta$  のみと比較してそれぞれ 73%、400% 有意に増加した。  
20 従って、GSK-3 阻害剤は会合型 A $\beta$  によるニューロン新生の抑制を解除する作用を持つことが明らかとなった。

以上より、GSK-3 を選択的に阻害する活性を持つ化合物は、アルツハイマー病等の神経疾患の神経再生薬になること、および該化合物は神経幹細胞のニューロン新生促進剤になることが示された。

25 実験例 11 : GSK-3 の阻害剤である Indirubin-3'-monoxime によるニューロン新生促進

実験例 1 に示した方法と同様の方法により、GSK-3 の阻害剤として報告されている Indirubin-3'-monoxime [J. Biol. Chem., 276, 251-260 (2001)、シグマアルドリッチ社製] を、1mmol/l になるように DMSO に溶解し、培養液の 1000 分

の1容量の該DMSO溶液を、ANSC-7細胞を含有する培地に添加し、分化誘導後6日目のTuj1陽性ニューロン数を解析した。陰性コントロールとして同容量のDMSOを添加した。その結果、終濃度 $1\mu\text{mol/l}$ のIndirubin-3'-monoximeの添加条件において、Tuj1陽性ニューロン数は陰性コントロールと比較して1.4倍に有意に増加した。従って、Indirubin-3'-monoximeはニューロン新生促進作用を持つことが明らかとなった。

以上より、リチウム、SB-216763、Kenpaulloneに限らず、GSK-3を阻害する活性を持つ化合物は、神経幹細胞のニューロン新生促進剤になるとともに、神経疾患の再生治療用医薬になることが示された。

#### 10 実験例12：GSK-3に対する特異的なsiRNAによるニューロン新生促進

short interference RNA (siRNA)は遺伝子の特異的にノックダウンする[Nature, 411, 494-498 (2001)]。成体神経幹細胞に発現するGSK-3を特異的に阻害することによりニューロン新生が促進できることをさらに明らかにするため、GSK-3 $\beta$ に対する特異的な化学合成siRNAをANSC-7細胞に導入し、ニューロン新生に対する効果を検討した。

まず、以下のとおりGSK-3 $\beta$ に対する2種の化学合成siRNAのANSC-7細胞でのノックダウン効果を検討した。ANSC-7細胞に対するsiRNAの導入はRat NSC Nucleofector™ Kit (Amaxa社製)を用いて行なった。 $1\times 10^6$ 個のANSC-7細胞に対して150pmolの配列番号14および15からなる2重鎖siRNA-B1または配列番号16および17からなる2重鎖siRNA-B2 (Dharmacon社製)を添付プロトコールに従って導入した。陰性コントロールとしてNon-specific Control Duplex IX (47% GC Content) siRNA (Dharmacon社製)を導入した。導入後直ちに5mlの分化誘導培地に懸濁し、ポリオルニチンおよびラミニンでコートした6センチ培養ディッシュに播種した。播種48時間後に細胞を1%のNonidet P-40、50mMのTris-HCl (pH7.4)、50mMのNaCl (以上、ナカライテスク社製)、10mlあたり一錠のComplete mini, EDTA free (ロシュ・ダイアグノスティックス社製)を含む水溶液に溶解して回収し、定法によりSDS-PAGE法で分離したのちウエスタンブロッティング法でGSK-3 $\beta$ 量を検出した。検出にはGSK-3 $\alpha$ および $\beta$ を認識する抗GSK-3抗体(シグマ社製)を用いた。その結果、2種のGSK-3 $\beta$ に対するsiRNAを導入した

細胞は両者とも陰性コントロールと比較してGSK-3 $\beta$ 量が9割以上減少し、GSK-3 $\alpha$ 量は変化しなかったため、それぞれのsiRNAはGSK-3 $\beta$ 特異的にノックダウンできることが明らかになった。

続いてそれら2種のsiRNAをANSC-7に導入後、直ちに1mlの分化誘導培地が入ったポリオルニチンおよびラミニンでコートした12穴培養ディッシュに1穴当たり  
5 1.8 $\times 10^5$ 個まき、分化を誘導した。実験例1に示した方法と同様の方法により、分化誘導後6日目のTuj1陽性ニューロン数を解析した。その結果、Tuj1陽性ニューロン数はsiRNA-B1を導入した細胞では陰性コントロールと比較して2.5倍に増加し、siRNA-B2を導入した細胞では1.9倍に増加した。従って、GSK-3 $\beta$ に  
10 対するsiRNAはニューロン新生促進作用を持つことが明らかとなった。

以上より、GSK-3を阻害する活性を持つ化合物およびsiRNAを含む核酸は、神経幹細胞のニューロン新生促進剤になるとともに、神経疾患の再生治療用医薬になることが示された。

参考例1：3-(2,4-ジクロロフェニル)-4-(1-メチルインドール-3-イル)-1H-ピロール-2,5-ジオン (SB-216763) の合成工程1：3-インドールグリオキシル酸メチルエステルの合成  
15

市販の3-インドールグリオキシル酸 (9.55 g) を塩化メチレン (300 mL) に懸濁し、氷冷下、オキサリルクロリド (8.8 mL) を加え、20℃で20時間攪拌した。反応液を氷冷し、メタノール (190 mL) を加えた後、反応液を25℃で1時間攪拌  
20 した。反応液に水および塩化メチレンを加え、析出した結晶を濾取し、結晶を塩化メチレンで洗浄した。結晶を減圧乾燥し、3-インドールグリオキシル酸メチルエステル (7.07 g, 69%) を得た。

工程2：2-(1-メチルインドール-3-イル)-2-オキソ酢酸メチルエステルの合成

25 工程1で得られた3-インドールグリオキシル酸メチルエステル (5.88 g) をN,N-ジメチルホルムアミド (180 mL) に溶解し、0℃で攪拌しながら、水素化ナトリウム (60%オイル分散、1.4 g) を少量ずつ加えた。反応混合物を1時間攪拌した後、ヨウ化メチル (1.2 mL) を加え、20℃で20時間攪拌した。氷冷水を反応液に添加した後、1 mol/L 塩酸でpH値を5に調整した。析出した結晶を濾取し、水で

洗浄した。結晶を減圧乾燥し、2-(1-メチルインドール-3-イル)-2-オキソ酢酸メチルエステル (1.96 g, 33%) を得た。

工程3: 2, 4-ジクロロフェニル酢酸アミド

市販の2, 4-ジクロロフェニル酢酸 (12.4 g) を塩化メチレン (350 mL) に溶解し、氷冷下、オキサリルクロリド (10.6 mL) を加え、20℃で20時間攪拌した。反応液を減圧濃縮し、得られた残渣を塩化メチレン (100 mL) に溶解した。この溶液を氷冷した28%アンモニア水溶液 (250 mL) に滴下し、塩化メチレンを減圧留去した。析出した結晶を濾取し、水で洗浄した。結晶を減圧乾燥し、2, 4-ジクロロフェニル酢酸アミド (11.14 g, 90%) を得た。

10 工程4: SB-216763 の合成

tert-ブトキシカリウム (0.5 g) をテトラヒドロフラン (35 mL) に溶解し、氷冷下、工程2で得られた2-(1-メチルインドール-3-イル)-2-オキソ酢酸メチルエステル (0.4 g)、次いで工程3で得られた2, 4-ジクロロフェニル酢酸アミド (0.3 g) を加え、同温度で3時間攪拌した。水を反応液に添加した後、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で順次洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した後、結晶をエタノールで洗浄した。結晶を減圧乾燥し、SB-216763 (390 mg, 70%) を得た。

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 3.89(s, 3H), 6.41(d, J = 8.1 Hz, 1H), 6.80(t, J = 7.1 Hz, 1H), 7.15(t, J = 7.1 Hz, 1H), 7.32-7.38(m, 3H), 7.49(s, 1H), 8.01(s, 1H), 10.94(s, 1H) 元素分析: 理論値 (C: 61.5, H: 3.3, N: 7.6)、測定値 (C: 61.3, H: 3.5, N: 7.4)

参考例2: ラット脳からの成体神経幹細胞の単離と培養

7週齢の Sprague Dawley rat をエーテル麻酔によって眠らせた後に断頭し、頭頂部より頭蓋骨を切開して脳を摘出した。摘出した脳から脳室周囲部位を含む組織を顕微鏡下で眼科用のはさみとピンセットを用いて分離した。脳室周囲部位を含む組織は眼科用はさみとメスを用いて1mm<sup>3</sup>程度の断片にした後、2.5U/ml のパパイン、250U/ml の DNase (いずれも Worthington, Freehold, NJ 社製)、1u/ml の中性プロテアーゼ (Dispase: Boehringer Mannheim 社製) を含む 5ml の HBSS 緩衝液 (Invitrogen 社製) 中で37℃、30分間消化反応を行なった。該反応により得られ

た細胞と組織の混合物を 10%の胎仔牛血清 (Hyclone 社製) を含む DMEM (Invitrogen 社製) で 3 回洗浄後、10%の胎仔牛血清を含む DMEM に溶解し、 $10^7 \mu\text{m}$  のナイロンメッシュを用いて未消化物を除去した。

- 得られた細胞粗抽出液を、10cm の培養皿上で 10%の胎仔牛血清を含む DMEM/F12 培地 (Invitrogen 社製) を用いて 37℃のインキュベーター中で 1 晩培養した。翌日、培地を 1%の N2 supplement (Invitrogen 社製) と 20ng/ml の FGF-2 (PeproTech 社製) を含む DMEM/F12 に置換して培養を開始した。3 日に一度、培地の半分を新しい 1%の N2 supplement と 20 ng/ml の FGF-2 を含む DMEM/F12 に置換し、培養を継続した。小型細胞の小さなコロニーが形成されたら 1%のトリプシンで 30 秒から 1 分間程度処理し、剥がれた細胞を回収した。該細胞は、 $10 \mu\text{g/ml}$  のポリオルニチン (シグマ社製) を用いて室温で一晩、および  $5 \mu\text{g/ml}$  のマウス EHS 腫瘍由来ラミニン (Becton Dickinson 社製) を用いて 37℃で一晩コートしたマルチ・ウエルの培養皿 (Fisher Scientific 社製) 上に撒き、培養を継続した。上記培養を続けることで、小型の突起を有し、厚みのある小型細胞が濃縮された。本細胞を成体神経幹細胞株 ANSC-7 として上記の実験に使用した。

発明を実施するための最良の形態

#### 実施例 1 : 錠剤

常法により、次の組成からなる錠剤を調製する。

20	(1) 処方	SB-216763	5mg
		乳糖	62mg
		馬鈴薯デンプン	30mg
		ポリビニルアルコール	2mg
		<u>ステアリン酸マグネシウム</u>	<u>1mg</u>
25			100mg
	(2)	Kenpaullone	5mg
		乳糖	62mg
		馬鈴薯デンプン	30mg

ポリビニルアルコール	2mg
<u>ステアリン酸マグネシウム</u>	<u>1mg</u>
	100mg

5	(3)	Indirubin-3' -monoxime	5mg
		乳糖	62mg
		馬鈴薯デンプン	30mg
		ポリビニルアルコール	2mg
		<u>ステアリン酸マグネシウム</u>	<u>1mg</u>
10			100mg

#### 実施例 2 : 神経幹細胞のニューロン新生促進剤 (1)

常法により、塩化リチウムを 3mol/l になるように PBS に溶解し、塩化リチウムを含む神経幹細胞のニューロン新生促進剤を調製した。

15

#### 実施例 3 : 神経幹細胞のニューロン新生促進剤 (2)

常法により、SB-216763、Kenpaullone または Indirubin-3' -monoxime を 0.1mmol/l になるように DMSO に溶解し、SB-216763、Kenpaullone または Indirubin-3' -monoxime を含む神経幹細胞のニューロン新生促進剤を調製した。

20

#### 産業上の利用可能性

本発明によれば、グリコーゲンシンターゼキナーゼ 3 の活性を阻害する物質を有効成分として含有してなる神経再生薬、該物質を有効成分として含有してなる神経幹細胞のニューロン新生促進剤、該ニューロン新生促進剤の存在下、神経幹細胞を培養して得られるニューロンおよび該ニューロンの製造方法を提供することができる。

25

#### 配列表フリーテキスト

配列番号 5 - 人工配列の説明 : 合成蛋白質

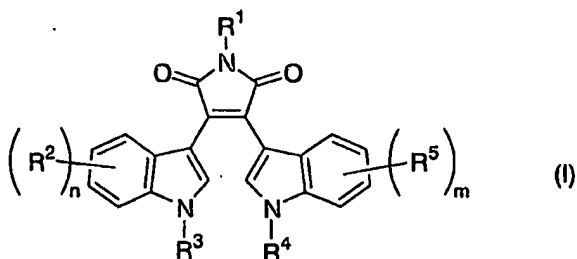
配列番号 6 - 人工配列の説明 : 合成 DNA



- 配列番号 7－人工配列の説明：合成DNA
- 配列番号 8－人工配列の説明：合成DNA
- 配列番号 9－人工配列の説明：合成DNA
- 配列番号 10－人工配列の説明：合成DNA
- 5 配列番号 11－人工配列の説明：合成DNA
- 配列番号 12－人工配列の説明：合成DNA
- 配列番号 13－人工配列の説明：合成DNA
- 配列番号 14－人工配列の説明：合成RNA
- 配列番号 15－人工配列の説明：合成RNA
- 10 配列番号 16－人工配列の説明：合成RNA
- 配列番号 17－人工配列の説明：合成RNA

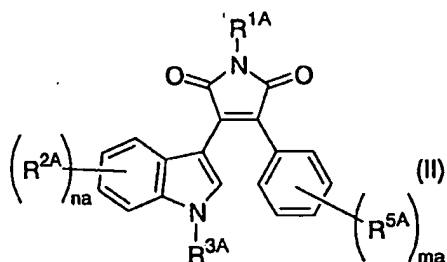
## 請求の範囲

1. グリコーゲンシンターゼキナーゼ-3（以下、GSK-3と略す）の活性を阻害する物質を有効成分として含有してなる神経再生薬。
2. 神経再生薬が、神経疾患の治療薬である請求項1記載の医薬。
- 5 3. 神経疾患が、パーキンソン病、アルツハイマー病、ダウン症、脳血管障害、脳卒中、脊髄損傷、ハンチントン舞踏病、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症、てんかん、不安障害、統合失調症、うつ病および躁鬱病からなる群より選ばれる神経疾患である請求項2記載の医薬。
4. GSK-3の活性を阻害する物質が、リチウムまたはその薬理学的に許容
- 10 される塩である請求項1～3のいずれか1項に記載の医薬。
5. GSK-3の活性を阻害する物質が、ビスインドリルマレイミド誘導体、3-アリール-4-インドリルマレイミド誘導体、インドロカルバゾール誘導体、インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン誘導体もしくはインジルピン誘導体またはそれらの薬理学的に許容される塩である請求項1～3のいずれか1項に記載の医
- 15 薬。
6. GSK-3の活性を阻害する物質が、式(I)

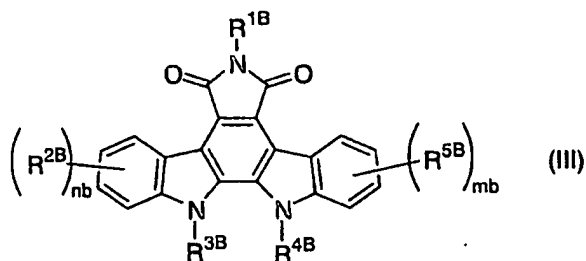


- [式中、n および m は同一または異なって、1～3 の整数を表し、R¹、R³ および R⁴ は同一または異なって、水素原子、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換の低級アルケニル、-COR⁶（式中、R⁶ は水素原子、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換の低級アルケニル、置換もしくは非置換のアリールまたは置換もしくは非置換のシクロアルキルを表す）、-COOR⁷（式中、R⁷ は水素原子、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換のアリールまたは置換もしくは非置換のシクロアルキルを表す）または-OR⁸（式中、R⁸ は水素原子、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換のアリールまたは置換もし

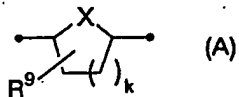
くは非置換のシクロアルキルを表す)を表し、 $R^2$ および $R^5$ は同一または異なって、水素原子、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換の低級アルケニル、置換もしくは非置換の低級アルコキシ、置換もしくは非置換の低級アルコキシカルボニル、置換もしくは非置換のアリール、カルボキシ、ハロゲン、ヒドロキシ、ニトロ、アミノまたはモノもしくはジ低級アルキルアミノを表し、 $n$ および $m$ がそれぞれ2または3であるとき、それぞれの $R^2$ および $R^5$ は同一でも異なってもよい]で表される化合物、式(II)



(式中、 $na$ 、 $ma$ 、 $R^{1A}$ 、 $R^{2A}$ 、 $R^{3A}$ および $R^{5A}$ は、それぞれ前記  $n$ 、 $m$ 、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ および $R^5$ と同義である)で表される化合物もしくは式(III)



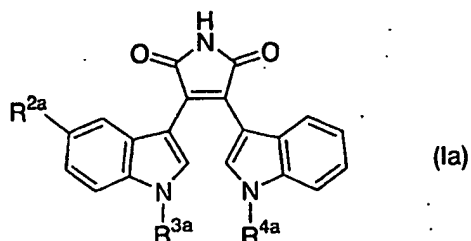
[式中、 $nb$ 、 $mb$ 、 $R^{1B}$ 、 $R^{2B}$ および $R^{5B}$ は、それぞれ前記  $n$ 、 $m$ 、 $R^1$ 、 $R^2$ および $R^5$ と同義であり、 $R^{3B}$ および $R^{4B}$ は同一または異なって、水素原子、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換の低級アルケニル、 $-COR^6$  (式中、 $R^6$ は前記と同義である)、 $-COOR^7$  (式中、 $R^7$ は前記と同義である)または $-OR^8$  (式中、 $R^8$ は前記と同義である)を表すか、または $R^{3B}$ と $R^{4B}$ が一緒になって、



(式中、 $k$ は1または2を表し、 $X$ は $CH_2$ 、 $NH$ 、酸素原子または硫黄原子を表し、 $R^9$ はヒドロキシ、カルボキシ、カルバモイルまたは低級アルコキシカルボニルを表す)を形成する]で表される化合物またはそれらの薬理学的に許容される塩である請求

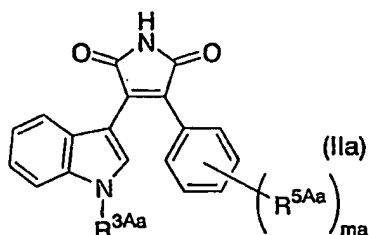
項1～3のいずれか1項に記載の医薬。

7. GSK-3の活性を阻害する物質が、式(Ia)



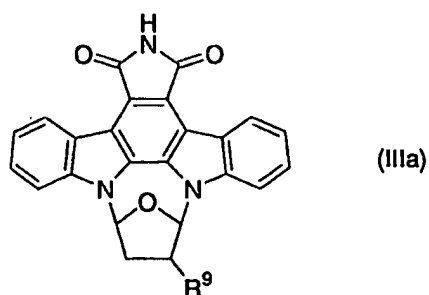
(式中、 $R^{2a}$  は水素原子、低級アルコキシ、低級アルコシカルボニル、アリールまたはニトロを表し、 $R^{3a}$  および  $R^{4a}$  は同一または異なって、置換もしくは非置換の低級アルキルを表す) で表される化合物またはその薬理学的に許容される塩である請求項1～3のいずれか1項に記載の医薬。

8. GSK-3の活性を阻害する物質が、式(IIa)



(式中、 $m_a$  は前記と同義であり、 $R^{3Aa}$  は置換もしくは非置換の低級アルキルを表し、 $R^{5Aa}$  はハロゲンを表す) で表される化合物またはその薬理学的に許容される塩である請求項1～3のいずれか1項に記載の医薬。

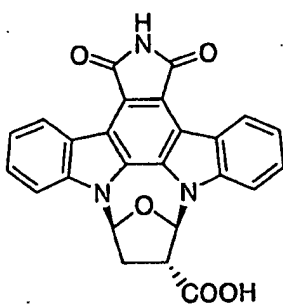
9. GSK-3の活性を阻害する物質が、式(IIIa)



(式中、 $R^9$  は前記と同義である) で表される化合物またはその薬理学的に許容される塩である請求項1～3のいずれか1項に記載の医薬。

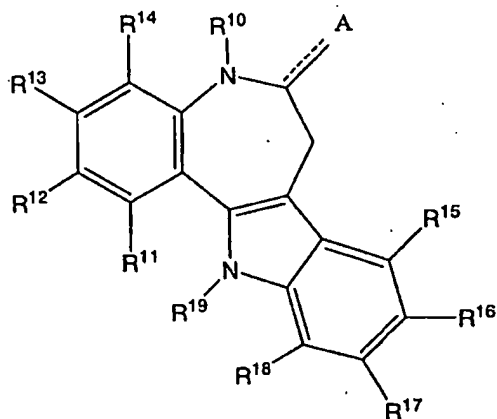
10. GSK-3の活性を阻害する物質が、3, 4-ビス(1-メチルインドール-3-イル)-1H-ピロール-2, 5-ジオン、3-(1-メチルインドール-3-イル)-4-(1-プロピルインドール-3-イル)-1H-ピロール-2,

- 5-ジオン、3-[1-(3-シアノプロピル)インドール-3-イル]-4-(1-メチルインドール-3-イル)-1H-ピロール-2, 5-ジオン、3-[1-(3-アミノプロピル)インドール-3-イル]-4-(1-メチルインドール-3-イル)-1H-ピロール-2, 5-ジオン、3-[1-(3-カルボキシプロピル)インドール-3-イル]-4-(1-メチルインドール-3-イル)-1H-ピロール-2, 5-ジオン、3-[1-(3-カルバモイルプロピル)インドール-3-イル]-4-(1-メチルインドール-3-イル)-1H-ピロール-2, 5-ジオン、3-[1-(3-アミノプロピル)インドール-3-イル]-4-(1-メチル-5-プロピルオキシインドール-3-イル)-1H-ピロール-2, 5-ジオン、3-[1-(3-ヒドロキシプロピル)インドール-3-イル]-4-(1-メチル-5-フェニルインドール-3-イル)-1H-ピロール-2, 5-ジオン、3-[1-(3-アミノプロピル)インドール-3-イル]-4-(1-メチル-5-フェニルインドール-3-イル)-1H-ピロール-2, 5-ジオン、3-[1-(3-ヒドロキシプロピル)インドール-3-イル]-4-(1-メチル-5-メトキシカルボニルインドール-3-イル)-1H-ピロール-2, 5-ジオン、3-[1-(3-ヒドロキシプロピル)インドール-3-イル]-4-(1-メチル-5-ニトロインドール-3-イル)-1H-ピロール-2, 5-ジオン、3-(1-メチルインドール-3-イル)-4-[1-(3-ヒドロキシプロピル)-5-ニトロインドール-3-イル]-1H-ピロール-2, 5-ジオン、3-(2-クロロフェニル)-4-(1-メチルインドール-3-イル)-1H-ピロール-2, 5-ジオン、3-(2,4-ジクロロフェニル)-4-(1-メチルインドール-3-イル)-1H-ピロール-2, 5-ジオン、3-(2-クロロフェニル)-4-[1-(3-ヒドロキシプロピル)インドール-3-イル]-1H-ピロール-2, 5-ジオン、4-[1-(3-アミノプロピル)インドール-3-イル]-3-(2-クロロフェニル)-1H-ピロール-2, 5-ジオンおよび



からなる群より選ばれる化合物またはその薬理学的に許容される塩である請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の医薬。

11. GSK-3 を阻害する物質が、式 (IV)



(IV)

5 [式中、A は単結合または二重結合によって右に結合されている酸素または硫黄であり、R<sup>10</sup> は水素原子、アリール、低級脂肪族置換基、特にアルキルおよび低級アルキルエステルからなる群より選択され、R<sup>11</sup>～R<sup>14</sup> はアルコキシ、アミノ、アシル、脂肪族置換基、特にアルキル、アルケニルおよびアルキニル置換基、脂肪族アルコール、特にアルキルアルコール、脂肪族ニトリル、特にアルキルニトリル、シアノ、  
10 ニトロ、カルボキシル、ハロゲン、水素原子、ヒドロキシル、イミノならびに  $\alpha$ 、 $\beta$  不飽和ケトンからなる群より個別に選択され、R<sup>15</sup>～R<sup>18</sup> は脂肪族置換基、特にアルキル、アルケニルおよびアルキニル置換基、特に低級脂肪族置換基、脂肪族アルコール、特にアルキルアルコール、アルコキシ、アシル、シアノ、ニトロ、エポキシ、  
15 シ、ハロアルキル基、ハロゲン、水素原子ならびにヒドロキシルからなる群より個別に選択され、R<sup>19</sup> は脂肪族の基、特に低級アルキル基、脂肪族アルコール、特にアルキルアルコール、カルボン酸、および水素からなる群より選択される] で表される化合物またはその薬理学的に許容される塩である請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の医薬。

12. GSK-3を阻害する物質が、7,12-ジヒドロ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、2-プロモ-7,12-ジヒドロ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、9-プロモ-7,12-ジヒドロ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、9-クロロ-7,12-ジヒドロ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、11-クロロ-7,12-ジヒドロ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、10-プロモ-7,12-ジヒドロ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、8-プロモ-6,11-ジヒドロ-チエノ[3',2':2,3アゼピノ[4,5-b]インドール-5(4H)-オン、9-プロモ-7,12-ジヒドロ-4-メトキシ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、9-プロモ-7,12-ジヒドロ-4-ヒドロキシ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、7,12-ジヒドロ-4-メトキシ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、9-プロモ-7,12-ジヒドロ-2,3-ジメトキシ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、9-プロモ-7,12-ジヒドロ-2,3-ジヒドロキシ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、7,12-ジヒドロ-2,3-ジメトキシ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、7,12-ジヒドロ-9-トリフルオロメチル-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、7,12-ジヒドロ-2,3-ジメトキシ-9-トリフルオロメチル-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、2-プロモ-7,12-ジヒドロ-9-トリフルオロメチル-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、9-プロモ-7,12-ジヒドロ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-チオン、9-プロモ-5,12-ビス-(*t*-ブチルオキシカルボニル)-7,12-ジヒドロ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、9-プロモ-12-(*t*-ブチルオキシカルボニル)-7,12-ジヒドロ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、9-プロモ-5,7-ビス-(*t*-ブチルオキシカルボニル)-7,12-ジヒドロ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、9-プロモ-5,7,12-トリ-(*t*-ブチルオキシカルボニル)-7,12-ジヒドロ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、9-プロモ-7,12-ジヒドロ-5-メチルオキシカルボニルメチル-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、9-プロモ-7,12-ジヒドロ-12-メチルオキシカルボニルメチル-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、9-プロモ-7,12-ジヒドロ-12-(2-ヒドロキシエチル)-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、2,9-ジプロモ-7,12-ジヒドロ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン

- 6 (5H)-オン、8,10-ジクロロ-7,12-ジヒドロ-インドロ [3,2-d] [1] ベンズアゼピン  
 -6 (5H)-オン、9-シアノ-7,12-ジヒドロ-インドロ [3,2-d] [1] ベンズアゼピン  
 -6 (5H)-オン、9-プロモ-7,12-ジヒドロ-5-メチル-インドロ [3,2-d] [1] ベンズアゼ  
 ピン-6 (5H)-オン、5-ベンジル-9-プロモ-7,12-ジヒドロ-5-メチル-インドロ  
 5 [3,2-d] [1] ベンズアゼピン-6 (5H)-オン、9-プロモ-7,12-ジヒドロ-12-メチル-イン  
 ドロ [3,2-d] [1] ベンズアゼピン-6 (5H)-オン、9-プロモ-12-エチル-7,12-ジヒドロ-  
 インドロ [3,2-d] [1] ベンズアゼピン-6 (5H)-オン、9-プロモ-7,12-ジヒドロ-12-(2-  
 プロペニル)-インドロ [3,2-d] [1] ベンズアゼピン-6 (5H)-オン、7,12-ジヒドロ-9-  
 メチル-インドロ [3,2-d] [1] ベンズアゼピン-6 (5H)-オン、7,12-ジヒドロ-9-メトキ  
 10 シ-インドロ [3,2-d] [1] ベンズアゼピン-6 (5H)-オン、9-フルオロ-7,12-ジヒドロ  
 -12-(2-プロペニル)-インドロ [3,2-d] [1] ベンズアゼピン-6 (5H)-オン、11-プロモ  
 -7,12-ジヒドロ-インドロ [3,2-d] [1] ベンズアゼピン-6 (5H)-オン、9-プロモ-7,12-  
 ジヒドロ-2-(メチルイミノアミン)-インドロ [3,2-d] [1] ベンズアゼピン-6 (5H)-オ  
 ン、9-プロモ-7,12-ジヒドロ-2-(カルボン酸)-インドロ [3,2-d] [1] ベンズアゼピン  
 15 -6 (5H)-オン、9-プロモ-7,12-ジヒドロ-10-ヒドロキシ-インドロ [3,2-d] [1] ベンズ  
 アゼピン-6 (5H)-オン、9-プロモ-7,12-ジヒドロ-11-ヒドロキシメチル-インドロ  
 [3,2-d] [1] ベンズアゼピン-6 (5H)-オン、7,12-ジヒドロ-4-ヒドロキシ-インドロ  
 [3,2-d] [1] ベンズアゼピン-6 (5H)-オン、7,12-ジヒドロ-2,3-ジヒドロキシ-インド  
 ロ [3,2-d] [1] ベンズアゼピン-6 (5H)-オン、2,3-ジメトキシ-9-ニトロ-7,12-ジヒド  
 20 ロ-インドロ [3,2-d] [1] ベンズアゼピン-6 (5H)-オン、9-シアノ-7,12-ジヒドロ-イ  
 ンドロ [3,2-d] [1] ベンズアゼピン-6 (5H)-オン、2,3-ジメトキシ-9-シアノ-7,12-ジ  
 ヒドロ-インドロ [3,2-d] [1] ベンズアゼピン-6 (5H)-オン、9-ニトロ-7,12-ジヒドロ  
 -インドロ [3,2-d] [1] ベンズアゼピン-6 (5H)-オン、3-(6-オキソ-9-トリフルオロメ  
 チル-5,6,7,12-テトラヒドロ-インドロ [3,2-d] [1] ベンズアゼピン-2-イル)プロピ  
 25 オニトリル、2-プロモ-9-ニトロ-7,12-ジヒドロ-インドロ [3,2-d] [1] ベンズアゼピ  
 ン-6 (5H)-オン、3-(6-オキソ-9-トリフルオロメチル-5,6,7,12-テトラヒドロ-イン  
 ドロ [3,2-d] [1] ベンズアゼピン-2-イル)アクリロニトリル、2-(3-ヒドロキシ-1-ブ  
 ロピニル)-9-トリフルオロメチル-7,12-ジヒドロ-インドロ [3,2-d] [1] ベンズアゼ  
 ピン-6 (5H)-オン、2-ヨード-9-プロモ-7,12-ジヒドロ-インドロ [3,2-d] [1] ベンズ



- アゼピン-6(5H)-オン、2-(3-オキソ-1-ブテニル)-9-トリフルオロメチル-7,12-テ  
 トラヒドロ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、8-クロロ-6,11-ジヒ  
 ドロ-チエノ[3',2':2,3]アゼピノ[4,5-b]インドール-5(4H)-オン、2-ヨード-9-トリ  
 フルオロメチル-7,12-ジヒドロ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、  
 5 オン、7,12-ジヒドロ-ピリド[3',2':4,5]ピロロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、  
 11-メチル-7,12-ジヒドロ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、  
 2-[2-(1-ヒドロキシシクロヘキシル)エチニル]-9-トリフルオロメチル-7,12-ジヒ  
 ドロ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、2-シアノ-7,12-ジヒドロ-  
 インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、2-ヨード-7,12-ジヒドロ-インド  
 10 ロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、11-エチル-7,12-ジヒドロ-インドロ  
 [3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、8-メチル-6,11-ジヒドロ-チエノ  
 [3',2':2,3]アゼピノ[4,5-b]インドール-5(4H)-オンおよび3-(6-オキソ-9-トリフ  
 ルオロメチル-5,6,7,12-テトラヒドロ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-2-イ  
 ル)アクリル酸メチルエステルからなる群より選ばれる化合物またはその薬理学的  
 15 に許容される塩である請求項1~3のいずれか1項に記載の医薬。

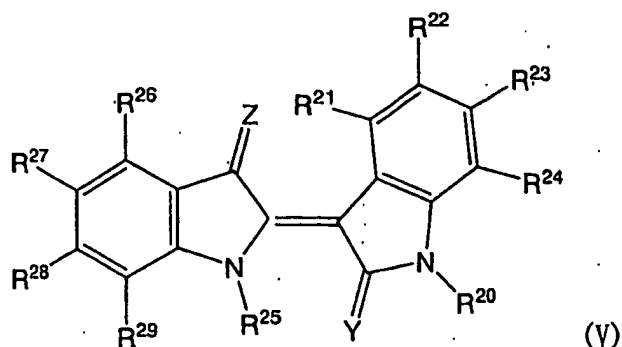
13. GSK-3を阻害する物質が、9-シアノ-7,12-ジヒドロ-インドロ  
 [3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、9-プロモ-7,12-ジヒドロ-2,3-ジメトキシ  
 -インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、2-プロモ-7,12-ジヒドロ-9-トリ  
 フルオロメチル-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、7,12-ジヒド  
 20 ロ-2,3-ジメトキシ-9-トリフルオロメチル-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン  
 -6(5H)-オン、2,9-ジプロモ-7,12-ジヒドロ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン  
 -6(5H)-オン、7,12-ジヒドロ-9-トリフルオロメチル-インドロ[3,2-d][1]ベンズア  
 ゼピン-6(5H)-オン、9-クロロ-7,12-ジヒドロ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン  
 -6(5H)-オン、8-プロモ-6,11-ジヒドロ-チエノ[3',2':2,3]アゼピノ[4,5-b]インド  
 25 ール-5(4H)-オン、7,12-ジヒドロ-9-メトキシ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン  
 -6(5H)-オン、10-プロモ-7,12-ジヒドロ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン  
 -6(5H)-オン、11-プロモ-7,12-ジヒドロ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン  
 -6(5H)-オン、11-クロロ-7,12-ジヒドロ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン  
 -6(5H)-オン、9-フルオロ-7,12-ジヒドロ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン

-6(5H)-オン、9-メチル-7,12-ジヒドロ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン  
-6(5H)-オン、9-プロモ-7,12-ジヒドロ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン  
-6(5H)-チオン、8,10-ジクロロ-7,12-ジヒドロ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピ  
ン-6(5H)-オン、9-プロモ-7,12-ジヒドロ-12-(2-ヒドロキシエチル)-インドロ  
5 [3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、9-プロモ-7,12-ジヒドロ-2,3-ジヒドロキ  
シ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、2-プロモ-7,12-ジヒドロ-イ  
ンドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、7,12-ジヒドロ-2,3-ジメトキシ-イ  
ンドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、9-プロモ-7,12-ジヒドロ-12-メチ  
ル-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、9-プロモ-7,12-ジヒドロ-5-  
10 メチルオキシカルボニルメチル-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン  
および7,12-ジヒドロ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オンからなる群  
より選択される、請求項1～3のいずれか1項に記載の医薬。

14. 9-シアノ-7,12-ジヒドロ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、  
9-プロモ-7,12-ジヒドロ-2,3-ジメトキシ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン  
15 -6(5H)-オン、2-プロモ-7,12-ジヒドロ-9-トリフルオロメチル-インドロ  
[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、7,12-ジヒドロ-2,3-ジメトキシ-9-トリフ  
ルオロメチル-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、2,9-ジプロモ  
-7,12-ジヒドロ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、7,12-ジヒドロ  
-9-トリフルオロメチル-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、9-クロ  
20 ロ-7,12-ジヒドロ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、8-プロモ  
-6,11-ジヒドロ-チエノ[3',2':2,3]アゼピノ[4,5-b]インドール-5(4H)-オン、  
7,12-ジヒドロ-9-メトキシ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オンから  
なる群より選択される、請求項1～3のいずれか1項に記載の医薬。

15. 9-プロモ-7,12-ジヒドロ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン  
25 からなる群より選択される、請求項1～3のいずれか1項に記載の医薬。

16. GSK-3を阻害する物質が、式(V)



- [式中、同じか異なってよい  $R^{20}$  および  $R^{25}$  は水素原子；ハロゲン；ヒドロキシ基；メチレンヒドロキシ基；直鎖または分枝鎖の  $C_1 \sim C_{18}$ -アルキルまたはアルコキシまたはメチレンアルコキシ基；必要に応じて1個または複数のヘテロ原子を含む、
- 5 3から7個-炭素原子を有するシクロアルキル基；必要に応じて1個または複数のヘテロ原子を有する置換または非置換のアリール、アラルキルまたはアリールオキシ基；それぞれ互いに独立に、直鎖または分枝鎖のアルキル基中に1から6個の炭素原子を有するモノー、ジーまたはトリアルキルシリル基；それぞれ互いに独立に置換または非置換アリール基を有するモノー、ジーまたはトリアリールシリル基；
- 10 トリフルオロメチル基；-COM；-COOM；あるいは- $CH_2COOM$ 基（ここでMは水素原子、必要ならばヒドロキシおよび／またはアミノ基1個または複数で置換された直鎖または分枝鎖の  $C_1 \sim C_{18}$ -アルキル基、または必要ならば1個または複数のヘテロ原子を有し、1個または複数のハロゲン、アルキル基またはアルコキシ基で置換されていてよいアリール基を表す）；- $NR^{30}R^{31}$ 基（ここで同じか
- 15 異なってよい  $R^{30}$  および  $R^{31}$  は水素原子、必要ならば付加的に1個または複数のヒドロキシおよび／またはアミノ基で置換されている  $C_1 \sim C_{18}$  直鎖または分枝鎖アルキル基、置換または非置換で、必要ならば1個または複数のヘテロ原子を含むアリール基を表す）；アシル基；- $CH_2-NR^{30}R^{31}$  メチレンアミノ基（ここで  $R^{30}$  および  $R^{31}$  は前記の意味を有する）；ベンゼン環が必要ならば1個または複数のヘ
- 20 テロ原子を有するベンジル基；必要ならば1個または複数のヘテロ原子を有する、炭素原子3から7個を有するメチレンシクロアルキル基；アミドとしての、窒素原子に結合した生理的アミノ酸基；グリコシドが単糖または二糖から選択されるO-グリコシドまたはN-グリコシド；あるいはメチレンスルホネート基を表し；同じか異なってよい  $R^{21}$ 、 $R^{22}$ 、 $R^{23}$ 、 $R^{24}$ 、 $R^{26}$ 、 $R^{27}$ 、 $R^{28}$  および  $R^{29}$  は水素原子；

- ハロゲン；ヒドロキシ基；ニトロソ基；ニトロ基；アルコキシ基；必要ならば1個または複数のヒドロキシおよび／またはアミノ基で置換されている直鎖または分枝鎖のC<sub>1</sub>～C<sub>18</sub> アルキル基；必要ならば1個または複数のヘテロ原子を有する置換または非置換のアリール基；必要ならば1個または複数のヘテロ原子を有する置換または非置換アラルキル基；必要ならば1個または複数のヘテロ原子を有する置換または非置換アリールオキシ基；必要ならば1個または複数のヘテロ原子を有する置換または非置換メチレンアリールオキシ基；必要ならば1個または複数のヘテロ原子を含む、3から7個の炭素原子を有するシクロアルキル基；必要ならば1個または複数のヘテロ原子を含む、3から7個の炭素原子を有するメチレンシクロアルキル基；トリフルオロメチル基；-COM；-COOM；またはCH<sub>2</sub>COOM基（ここでMは水素原子、必要ならばヒドロキシおよび／またはアミノ基1個または複数の付加的に置換された直鎖または分枝鎖のC<sub>1</sub>～C<sub>18</sub>-アルキル基、または必要ならば1個または複数のヘテロ原子を有し、1個または複数のハロゲン原子、アルキル基またはアルコキシ基で置換されていてよいアリール基を表す）；-NR<sup>30</sup>
- 15 R<sup>31</sup>基（ここで同じか異なってよいR<sup>30</sup>およびR<sup>31</sup>は水素原子、必要ならば付加的に1個または複数のヒドロキシおよび／またはアミノ基で置換されている直鎖または分枝鎖C<sub>1</sub>～C<sub>18</sub> アルキル基、置換または非置換で、必要ならば1個または複数のヘテロ原子を含むアリール基、アシル基を表すか、窒素原子が、必要ならば1個または複数のヘテロ原子を含む、炭素原子3から7個を有するシクロアルキルの一部を形成する）；-CONR<sup>30</sup>R<sup>31</sup>基（ここでR<sup>30</sup>およびR<sup>31</sup>は前記の意味を有する）；ヒドロキシルアミノ基；ホスフェート基；ホスホネート基；スルフェート基；スルホネート基；スルホンアミド基；-SO<sub>2</sub>NR<sup>30</sup>R<sup>31</sup>基（ここでR<sup>30</sup>およびR<sup>31</sup>は前記の意味を有する）；-N=N-R<sup>32</sup>アゾ基（ここでR<sup>32</sup>は必要ならば1個または複数のカルボキシル、ホスホリルまたはスルホネート基で置換された芳香族基
- 25 あるいはグリコシドが単糖または二糖から選択されているO-グリコシドまたはN-グリコシド基を表す）を表すか；R<sup>20</sup>およびR<sup>24</sup>ならびにR<sup>25</sup>およびR<sup>29</sup>はそれぞれ一緒になって、互いに独立に必要な置換された1から4個のCH<sub>2</sub>基を有する環を形成し；同じか異なってよいYおよびZは酸素；イオウ；セレン；テルルの原子；NR<sup>33</sup>基（ここでR<sup>33</sup>は水素原子、必要ならば1個または複数のカルボ

キシル、ホスホリルまたはスルホネート基で置換された直鎖または分枝鎖  $C_1 \sim C_{18}$  アルキル基、必要ならば1個または複数のヘテロ原子を含む置換または非置換のアリール基、アラルキル基またはスルホネート基を表す) ; あるいは  $-NOR^{33}$  (ここで  $R^{33}$  基は前記の意味を有する) を表す] で表される化合物またはそれらの薬理学的に許容される塩である請求項1~3のいずれか1項に記載の医薬。

17. GSK-3を阻害する物質が、インジルピン、5-ヨードインジルピン、5-プロモインジルピン、5-クロロインジルピン、5-フルオロインジルピン、5-メチルインジルピン、5-ニトロインジルピン、5- $SO_3H$ -インジルピン、5'-プロモインジルピン、5-5'-ジプロモインジルピンおよび5'-プロモインジルピン5-スルホン酸からなる群より選ばれる化合物またはその薬理学的に許容される塩である請求項1~3のいずれか1項に記載の医薬。

18. GSK-3を阻害する物質が、インジルピン-3'-モノオキシム、5-ヨードインジルピン-3'-モノオキシムおよび5- $SO_3Na$ -インジルピン-3'-モノオキシムからなる群より選ばれる化合物またはその薬理学的に許容される塩である請求項1~3のいずれか1項に記載の医薬。

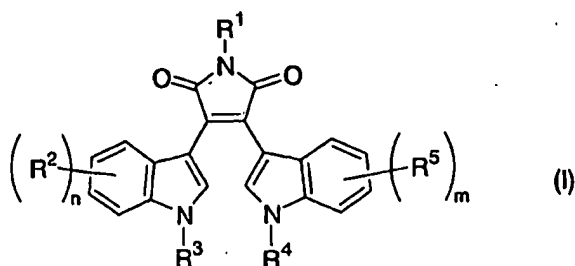
19. GSK-3を阻害する物質が、インジルピン-3'-モノオキシムまたはその薬理学的に許容される塩である請求項1~3のいずれか1項に記載の医薬。

20. GSK-3の活性を阻害する物質を有効成分として含有してなる神経幹細胞のニューロン新生促進剤。

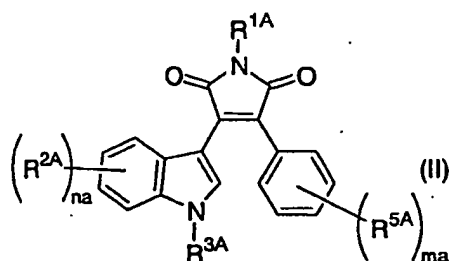
21. GSK-3の活性を阻害する物質が、リチウムまたはその薬理学的に許容される塩である請求項20記載のニューロン新生促進剤。

22. GSK-3の活性を阻害する物質が、ビスインドリルマレイミド誘導体、3-アリール-4-インドリルマレイミド誘導体、インドロカルバゾール誘導体もしくはインドロ[3,2d-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン誘導体またはそれらの薬理学的に許容される塩である請求項20記載のニューロン新生促進剤。

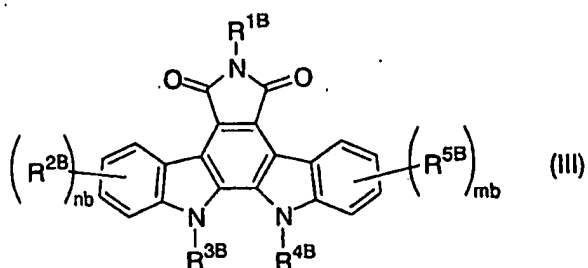
23. GSK-3の活性を阻害する物質が、式(I)



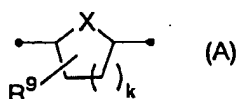
- [式中、 $n$  および  $m$  は同一または異なって、1~3 の整数を表し、 $R^1$ 、 $R^3$  および  $R^4$  は同一または異なって、水素原子、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換の低級アルケニル、 $-\text{COR}^6$  (式中、 $R^6$  は水素原子、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換の低級アルケニル、置換もしくは非置換のアリールまたは置換もしくは非置換のシクロアルキルを表す)、 $-\text{COOR}^7$  (式中、 $R^7$  は水素原子、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換のアリールまたは置換もしくは非置換のシクロアルキルを表す) または  $-\text{OR}^8$  (式中、 $R^8$  は水素原子、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換のアリールまたは置換もしくは非置換のシクロアルキルを表す) を表し、 $R^2$  および  $R^5$  は同一または異なって、水素原子、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換の低級アルケニル、置換もしくは非置換の低級アルコキシ、置換もしくは非置換の低級アルコキシカルボニル、置換もしくは非置換のアリール、カルボキシ、ハロゲン、ヒドロキシ、ニトロ、アミノまたはモノもしくはジ低級アルキルアミノを表し、 $n$  および  $m$  がそれぞれ 2 または 3 であるとき、それぞれの  $R^2$  および  $R^5$  は同一でも異なってもよい] で表される化合物、式(II)



(式中、 $na$ 、 $ma$ 、 $R^{1A}$ 、 $R^{2A}$ 、 $R^{3A}$  および  $R^{5A}$  は、それぞれ前記  $n$ 、 $m$ 、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$  および  $R^5$  と同義である) で表される化合物もしくは式(III)

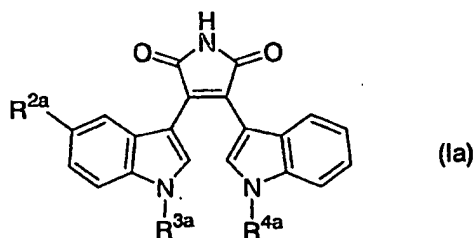


- 〔式中、nb、mb、 $R^{1B}$ 、 $R^{2B}$ および $R^{5B}$ は、それぞれ前記 n、m、 $R^1$ 、 $R^2$ および $R^5$ と同義であり、 $R^{3B}$ および $R^{4B}$ は同一または異なって、水素原子、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換の低級アルケニル、 $-\text{COR}^6$ （式中、 $R^6$ は前記と同義である）、 $-\text{COOR}^7$ （式中、 $R^7$ は前記と同義である）または $-\text{OR}^8$ （式中、 $R^8$ は前記と同義である）を表すか、または $R^{3B}$ と $R^{4B}$ が一緒になって、



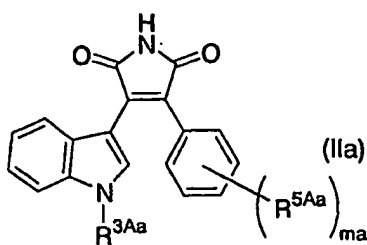
- （式中、k は 1 または 2 を表し、X は  $\text{CH}_2$ 、NH、酸素原子または硫黄原子を表し、 $R^9$  はヒドロキシ、カルボキシ、カルバモイルまたは低級アルコキシカルボニルを表す）を形成する〕で表される化合物またはそれらの薬理学的に許容される塩である請求項 20 記載のニューロン新生促進剤。

24. GSK-3 の活性を阻害する物質が、式 (Ia)



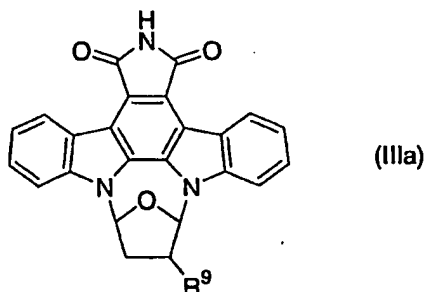
- （式中、 $R^{2a}$  は水素原子、低級アルコキシ、低級アルコキシカルボニル、アリールまたはニトロを表し、 $R^{3a}$  および  $R^{4a}$  は同一または異なって、置換もしくは非置換の低級アルキルを表す）で表される化合物またはその薬理学的に許容される塩である請求項 20 記載のニューロン新生促進剤。

25. GSK-3 の活性を阻害する物質が、式 (IIa)



(式中、 $m_a$  は前記と同義であり、 $R^{3Aa}$  は置換もしくは非置換の低級アルキルを表し、 $R^{5Aa}$  はハロゲンを表す) で表される化合物またはその薬理学的に許容される塩である請求項 20 記載のニューロン新生促進剤。

5      26.      GSK-3 の活性を阻害する物質が、式 (IIIa)

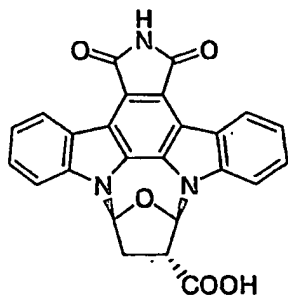


(式中、 $R^9$  は前記と同義である) で表される化合物またはその薬理学的に許容される塩である請求項 20 記載のニューロン新生促進剤。

27.      GSK-3 の活性を阻害する物質が、3, 4-ビス (1-メチルインドール-3-イル) -1H-ピロール-2, 5-ジオン、3- (1-メチルインドール-3-イル) -4- (1-プロピルインドール-3-イル) -1H-ピロール-2, 5-ジオン、3- [1- (3-シアノプロピル) インドール-3-イル] -4- (1-メチルインドール-3-イル) -1H-ピロール-2, 5-ジオン、3- [1- (3-アミノプロピル) インドール-3-イル] -4- (1-メチルインドール-3-イル) -1H-ピロール-2, 5-ジオン、3- [1- (3-カルボキシプロピル) インドール-3-イル] -4- (1-メチルインドール-3-イル) -1H-ピロール-2, 5-ジオン、3- [1- (3-カルバモイルプロピル) インドール-3-イル] -4- (1-メチルインドール-3-イル) -1H-ピロール-2, 5-ジオン、3- [1- (3-アミノプロピル) インドール-3-イル] -4- (1-メチル-5-プロピルオキシインドール-3-イル) -1H-ピロール-2, 5-ジオン、3- [1- (3-ヒドロキシプロピル) インドール-3-イル] -4- (1-メチル-5-フェニルインドール-3-イル) -1H-ピロール-2, 5-

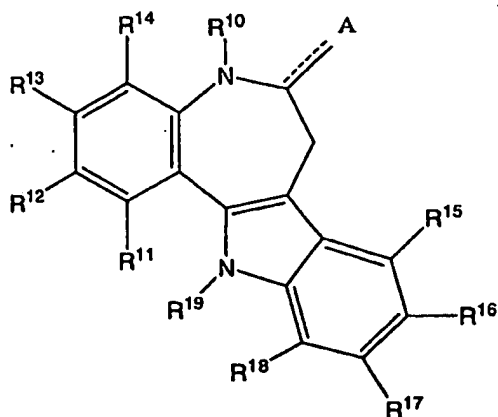


- ジオン、3-[1-(3-アミノプロピル)インドール-3-イル]-4-(1-  
 メチル-5-フェニルインドール-3-イル)-1H-ピロール-2,5-ジオン、  
 3-[1-(3-ヒドロキシプロピル)インドール-3-イル]-4-(1-メチ  
 ル-5-メトキシカルボニルインドール-3-イル)-1H-ピロール-2,5-  
 ジオン、3-[1-(3-ヒドロキシプロピル)インドール-3-イル]-4-(1-  
 5   メチル-5-ニトロインドール-3-イル)-1H-ピロール-2,5-ジオン、  
 3-(1-メチルインドール-3-イル)-4-[1-(3-ヒドロキシプロピル)  
 -5-ニトロインドール-3-イル]-1H-ピロール-2,5-ジオン、3-(2-  
 クロロフェニル)-4-(1-メチルインドール-3-イル)-1H-ピロール  
 10   -2,5-ジオン、3-(2,4-ジクロロフェニル)-4-(1-メチルインド  
 ール-3-イル)-1H-ピロール-2,5-ジオン、3-(2-クロロフェニル)  
 -4-[1-(3-ヒドロキシプロピル)インドール-3-イル]-1H-ピロ  
 ール-2,5-ジオン、4-[1-(3-アミノプロピル)インドール-3-イル]  
 -3-(2-クロロフェニル)-1H-ピロール-2,5-ジオンおよび



からなる群より選ばれる化合物またはその薬理学的に許容される塩である請求項  
 20記載のニューロン新生促進剤。

28. GSK-3を阻害する物質が、式(IV)



(IV)

[式中、A は単結合または二重結合によって右に結合されている酸素または硫黄であり、 $R^{10}$  は水素原子、アリール、低級脂肪族置換基、特にアルキルおよび低級アルキルエステルからなる群より選択され、 $R^{11} \sim R^{14}$  はアルコキシ、アミノ、アシル、脂肪族置換基、特にアルキル、アルケニルおよびアルキニル置換基、脂肪族アルコール、特にアルキルアルコール、脂肪族ニトリル、特にアルキルニトリル、シアノ、ニトロ、カルボキシル、ハロゲン、水素原子、ヒドロキシル、イミノならびに  $\alpha$ 、 $\beta$  不飽和ケトンからなる群より個別に選択され、 $R^{15} \sim R^{18}$  は脂肪族置換基、特にアルキル、アルケニルおよびアルキニル置換基、特に低級脂肪族置換基、脂肪族アルコール、特にアルキルアルコール、アルコキシ、アシル、シアノ、ニトロ、エポキシ、ハロアルキル基、ハロゲン、水素原子ならびにヒドロキシルからなる群より個別に選択され、 $R_{19}$  は脂肪族の基、特に低級アルキル基、脂肪族アルコール、特にアルキルアルコール、カルボン酸、および水素からなる群より選択される] で表される化合物またはその薬理学的に許容される塩である請求項 20 記載のニューロン新生促進剤。

29. 7,12-ジヒドロ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、2-プロモ-7,12-ジヒドロ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、9-プロモ-7,12-ジヒドロ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、9-クロロ-7,12-ジヒドロ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、11-クロロ-7,12-ジヒドロ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、10-プロモ-7,12-ジヒドロ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、8-プロモ-6,11-ジヒドロ-チエノ[3',2':2,3]アゼピノ[4,5-b]インドール-5(4H)-オン、9-プロモ-7,12-ジヒドロ-4-メトキシ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、9-プロモ-7,12-ジヒドロ-4-ヒドロキシ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、7,12-ジヒドロ-4-メトキシ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、9-プロモ-7,12-ジヒドロ-2,3-ジメトキシ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、9-プロモ-7,12-ジヒドロ-2,3-ジヒドロキシ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、7,12-ジヒドロ-2,3-ジメトキシ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、7,12-ジヒドロ-9-トリフルオロメチル-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、7,12-ジヒドロ-2,3-ジメトキシ-9-トリフルオロメチル-インドロ

- [3, 2-d] [1] ベンズアゼピン-6 (5H)-オン、2-ブロモ-7, 12-ジヒドロ-9-トリフルオロメチル-インドロ [3, 2-d] [1] ベンズアゼピン-6 (5H)-オン、9-ブロモ-7, 12-ジヒドロ-インドロ [3, 2-d] [1] ベンズアゼピン-6 (5H)-チオン、9-ブロモ-5, 12-ビス-(*t*-ブチルオキシカルボニル)-7, 12-ジヒドロ-インドロ [3, 2-d] [1] ベンズアゼピン-6 (5H)-オン、9-ブロモ-12-(*t*-ブチルオキシカルボニル)-7, 12-ジヒドロ-インドロ [3, 2-d] [1] ベンズアゼピン-6 (5H)-オン、9-ブロモ-5, 7-ビス-(*t*-ブチルオキシカルボニル)-7, 12-ジヒドロ-インドロ [3, 2-d] [1] ベンズアゼピン-6 (5H)-オン、9-ブロモ-5, 7, 12-トリ-(*t*-ブチルオキシカルボニル)-7, 12-ジヒドロ-インドロ [3, 2-d] [1] ベンズアゼピン-6 (5H)-オン、9-ブロモ-7, 12-ジヒドロ-5-メチルオキシカルボニルメチル-インドロ [3, 2-d] [1] ベンズアゼピン-6 (5H)-オン、9-ブロモ-7, 12-ジヒドロ-12-メチルオキシカルボニルメチル-インドロ [3, 2-d] [1] ベンズアゼピン-6 (5H)-オン、9-ブロモ-7, 12-ジヒドロ-12-(2-ヒドロキシエチル)-インドロ [3, 2-d] [1] ベンズアゼピン-6 (5H)-オン、2, 9-ジブロモ-7, 12-ジヒドロ-インドロ [3, 2-d] [1] ベンズアゼピン-6 (5H)-オン、8, 10-ジクロロ-7, 12-ジヒドロ-インドロ [3, 2-d] [1] ベンズアゼピン-6 (5H)-オン、9-シアノ-7, 12-ジヒドロ-インドロ [3, 2-d] [1] ベンズアゼピン-6 (5H)-オン、9-ブロモ-7, 12-ジヒドロ-5-メチル-インドロ [3, 2-d] [1] ベンズアゼピン-6 (5H)-オン、5-ベンジル-9-ブロモ-7, 12-ジヒドロ-5-メチル-インドロ [3, 2-d] [1] ベンズアゼピン-6 (5H)-オン、9-ブロモ-7, 12-ジヒドロ-12-メチル-インドロ [3, 2-d] [1] ベンズアゼピン-6 (5H)-オン、9-ブロモ-12-エチル-7, 12-ジヒドロ-インドロ [3, 2-d] [1] ベンズアゼピン-6 (5H)-オン、9-ブロモ-7, 12-ジヒドロ-12-(2-プロペニル)-インドロ [3, 2-d] [1] ベンズアゼピン-6 (5H)-オン、7, 12-ジヒドロ-9-メチル-インドロ [3, 2-d] [1] ベンズアゼピン-6 (5H)-オン、7, 12-ジヒドロ-9-メトキシ-インドロ [3, 2-d] [1] ベンズアゼピン-6 (5H)-オン、9-フルオロ-7, 12-ジヒドロ-12-(2-プロペニル)-インドロ [3, 2-d] [1] ベンズアゼピン-6 (5H)-オン、11-ブロモ-7, 12-ジヒドロ-インドロ [3, 2-d] [1] ベンズアゼピン-6 (5H)-オン、9-ブロモ-7, 12-ジヒドロ-2-(メチルイミノアミン)-インドロ [3, 2-d] [1] ベンズアゼピン-6 (5H)-オン、9-ブロモ-7, 12-ジヒドロ-2-(カルボン酸)-インドロ [3, 2-d] [1] ベンズアゼピン-6 (5H)-オン、9-ブロモ-7, 12-ジヒドロ-10-ヒドロキシ-インドロ [3, 2-d] [1] ベンズアゼピン-6 (5H)-オン、9-ブロモ-7, 12-

ジヒドロ-11-ヒドロキシメチル-インドロ[3, 2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、  
 7, 12-ジヒドロ-4-ヒドロキシ-インドロ[3, 2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、  
 7, 12-ジヒドロ-2, 3-ジヒドロキシ-インドロ[3, 2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、  
 2, 3-ジメトキシ-9-ニトロ-7, 12-ジヒドロ-インドロ[3, 2-d][1]ベンズアゼピン  
 5 -6(5H)-オン、9-シアノ-7, 12-ジヒドロ-インドロ[3, 2-d][1]ベンズアゼピン  
 -6(5H)-オン、2, 3-ジメトキシ-9-シアノ-7, 12-ジヒドロ-インドロ[3, 2-d][1]ベン  
 ズアゼピン-6(5H)-オン、9-ニトロ-7, 12-ジヒドロ-インドロ[3, 2-d][1]ベンズアゼ  
 ピン-6(5H)-オン、3-(6-オキソ-9-トリフルオロメチル-5, 6, 7, 12-テトラヒドロ-イ  
 ンドロ[3, 2-d][1]ベンズアゼピン-2-イル)プロピオニトリル、2-ブロモ-9-ニトロ  
 10 -7, 12-ジヒドロ-インドロ[3, 2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、3-(6-オキソ-9-  
 トリフルオロメチル-5, 6, 7, 12-テトラヒドロ-インドロ[3, 2-d][1]ベンズアゼピン  
 -2-イル)アクリロニトリル、2-(3-ヒドロキシ-1-プロピニル)-9-トリフルオロメ  
 チル-7, 12-ジヒドロ-インドロ[3, 2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、2-ヨード  
 -9-ブロモ-7, 12-ジヒドロ-インドロ[3, 2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、2-(3-  
 15 オキソ-1-ブテニル)-9-トリフルオロメチル-7, 12-テトラヒドロ-インドロ  
 [3, 2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、8-クロロ-6, 11-ジヒドロ-チエノ  
 [3', 2': 2, 3]アゼピノ[4, 5-b]インドール-5(4H)-オン、2-ヨード-9-トリフルオロメ  
 チル-7, 12-ジヒドロ-インドロ[3, 2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、7, 12-ジヒ  
 ドロ-ピリド[3', 2': 4, 5]ピロロ[3, 2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、11-メチル  
 20 -7, 12-ジヒドロ-インドロ[3, 2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、2-[2-(1-ヒドロ  
 キシシクロヘキシル)エチニル]-9-トリフルオロメチル-7, 12-ジヒドロ-インドロ  
 [3, 2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、2-シアノ-7, 12-ジヒドロ-インドロ  
 [3, 2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、2-ヨード-7, 12-ジヒドロ-インドロ  
 [3, 2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、11-エチル-7, 12-ジヒドロ-インドロ  
 25 [3, 2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、8-メチル-6, 11-ジヒドロ-チエノ  
 [3', 2': 2, 3]アゼピノ[4, 5-b]インドール-5(4H)-オンおよび3-(6-オキソ-9-トリフ  
 ルオロメチル-5, 6, 7, 12-テトラヒドロ-インドロ[3, 2-d][1]ベンズアゼピン-2-イ  
 ル)アクリル酸メチルエステルからなる群より選択される、請求項20記載のニュー  
 ーロン新生促進剤。

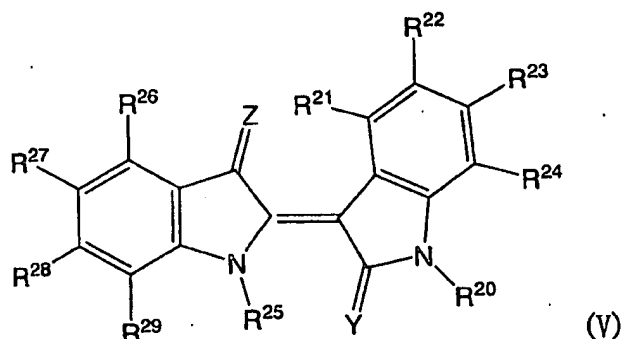
30. 9-シアノ-7,12-ジヒドロ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、  
 9-プロモ-7,12-ジヒドロ-2,3-ジメトキシ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン  
 -6(5H)-オン、2-プロモ-7,12-ジヒドロ-9-トリフルオロメチル-インドロ  
 [3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、7,12-ジヒドロ-2,3-ジメトキシ-9-トリフ  
 5 ルオロメチル-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、2,9-ジプロモ  
 -7,12-ジヒドロ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、7,12-ジヒドロ  
 -9-トリフルオロメチル-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、9-クロ  
 ロ-7,12-ジヒドロ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、8-プロモ  
 -6,11-ジヒドロ-チエノ[3',2':2,3]アゼピノ[4,5-b]インドール-5(4H)-オン、  
 10 7,12-ジヒドロ-9-メトキシ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、10-  
 プロモ-7,12-ジヒドロ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、11-プロ  
 モ-7,12-ジヒドロ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、11-クロ  
 ロ-7,12-ジヒドロ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、9-フルオロ  
 -7,12-ジヒドロ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、9-メチル-7,12-  
 15 ジヒドロ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、9-プロモ-7,12-ジヒド  
 ロ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-チオン、8,10-ジクロロ-7,12-ジヒ  
 ドロ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、9-プロモ-7,12-ジヒドロ  
 -12-(2-ヒドロキシエチル)-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、9-プ  
 ロモ-7,12-ジヒドロ-2,3-ジヒドロキシ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン  
 20 -6(5H)-オン、2-プロモ-7,12-ジヒドロ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン  
 -6(5H)-オン、7,12-ジヒドロ-2,3-ジメトキシ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン  
 -6(5H)-オン、9-プロモ-7,12-ジヒドロ-12-メチル-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼ  
 ピン-6(5H)-オン、9-プロモ-7,12-ジヒドロ-5-メチルオキシカルボニルメチル-イ  
 ンドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オンおよび 7,12-ジヒドロ-インドロ  
 25 [3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オンからなる群より選択される、請求項20記  
 載のニューロン新生促進剤。

31. 9-シアノ-7,12-ジヒドロ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン-6(5H)-オン、  
 9-プロモ-7,12-ジヒドロ-2,3-ジメトキシ-インドロ[3,2-d][1]ベンズアゼピン  
 -6(5H)-オン、2-プロモ-7,12-ジヒドロ-9-トリフルオロメチル-インドロ

[3, 2-d] [1] ベンズアゼピン-6 (5H)-オン、7, 12-ジヒドロ-2, 3-ジメトキシ-9-トリフル  
 ルオロメチル-インドロ [3, 2-d] [1] ベンズアゼピン-6 (5H)-オン、2, 9-ジプロモ  
 -7, 12-ジヒドロ-インドロ [3, 2-d] [1] ベンズアゼピン-6 (5H)-オン、7, 12-ジヒドロ  
 -9-トリフルオロメチル-インドロ [3, 2-d] [1] ベンズアゼピン-6 (5H)-オン、9-クロ  
 5 ロ-7, 12-ジヒドロ-インドロ [3, 2-d] [1] ベンズアゼピン-6 (5H)-オン、8-プロモ  
 -6, 11-ジヒドロ-チエノ [3', 2': 2, 3] アゼピノ [4, 5-b] インドール-5 (4H)-オン、  
 7, 12-ジヒドロ-9-メトキシ-インドロ [3, 2-d] [1] ベンズアゼピン-6 (5H)-オンから  
 なる群より選択される、請求項 20 記載のニューロン新生促進剤。

32. 9-プロモ-7, 12-ジヒドロ-インドロ [3, 2-d] [1] ベンズアゼピン-6 (5H)-オン  
 10 からなる群より選択される、請求項 20 記載のニューロン新生促進剤。

33. GSK-3 を阻害する物質が、式 (V)



[式中、同じか異なってよい R<sup>20</sup> および R<sup>25</sup> は水素原子；ハロゲン；ヒドロキシ基；  
 メチレンヒドロキシ基；直鎖または分枝鎖の C<sub>1</sub>~C<sub>18</sub>-アルキルまたはアルコキシ  
 15 またはメチレンアルコキシ基；必要に応じて 1 個または複数のヘテロ原子を含む、  
 3 から 7 個一炭素原子を有するシクロアルキル基；必要に応じて 1 個または複数の  
 ヘテロ原子を有する置換または非置換のアリール、アラルキルまたはアリールオキ  
 シ基；それぞれ互いに独立に、直鎖または分枝鎖のアルキル基中に 1 から 6 個の炭  
 素原子を有するモノー、ジーまたはトリアルキルシリル基；それぞれ互いに独立に  
 20 置換または非置換アリール基を有するモノー、ジーまたはトリアリールシリル基；  
 トリフルオロメチル基；-COM；-COOM；あるいは-CH<sub>2</sub>COOM 基（こ  
 こで M は水素原子、必要ならばヒドロキシおよび／またはアミノ基 1 個または複数  
 で置換された直鎖または分枝鎖の C<sub>1</sub>~C<sub>18</sub>-アルキル基、または必要ならば 1 個ま  
 たは複数のヘテロ原子を有し、1 個または複数のハロゲン、アルキル基またはアル

- コキシ基で置換されていてよいアリール基を表す);  $-NR^{30}R^{31}$  基 (ここで同じか異なってよい  $R^{30}$  および  $R^{31}$  は水素原子、必要ならば付加的に 1 個または複数のヒドロキシおよび/またはアミノ基で置換されている  $C_1 \sim C_{18}$  直鎖または分枝鎖アルキル基、置換または非置換で、必要ならば 1 個または複数のヘテロ原子を含むアリール基を表す); アシル基;  $-CH_2-NR^{30}R^{31}$  メチレンアミノ基 (ここで  $R^{30}$  および  $R^{31}$  は前記の意味を有する); ベンゼン環が必要ならば 1 個または複数のヘテロ原子を有するベンジル基; 必要ならば 1 個または複数のヘテロ原子を有する、炭素原子 3 から 7 個を有するメチレンシクロアルキル基; アミドとしての、窒素原子に結合した生理的アミノ酸基; グリコシドが単糖または二糖から選択される  $O$ -グリコシドまたは  $N$ -グリコシド; あるいはメチレンスルホネート基を表し; 同じか異なってよい  $R^{21}$ 、 $R^{22}$ 、 $R^{23}$ 、 $R^{24}$ 、 $R^{26}$ 、 $R^{27}$ 、 $R^{28}$  および  $R^{29}$  は水素原子; ハロゲン; ヒドロキシ基; ニトロソ基; ニトロ基; アルコキシ基; 必要ならば 1 個または複数のヒドロキシおよび/またはアミノ基で置換されている直鎖または分枝鎖の  $C_1 \sim C_{18}$  アルキル基; 必要ならば 1 個または複数のヘテロ原子を有する置換または非置換のアリール基; 必要ならば 1 個または複数のヘテロ原子を有する置換または非置換アラルキル基; 必要ならば 1 個または複数のヘテロ原子を有する置換または非置換アリールオキシ基; 必要ならば 1 個または複数のヘテロ原子を有する置換または非置換メチレンアリールオキシ基; 必要ならば 1 個または複数のヘテロ原子を含む、3 から 7 個の炭素原子を有するシクロアルキル基; 必要ならば 1 個または複数のヘテロ原子を含む、3 から 7 個の炭素原子を有するメチレンシクロアルキル基; トリフルオロメチル基;  $-COM$ ;  $-COOM$ ; または  $CH_2COOM$  基 (ここで  $M$  は水素原子、必要ならばヒドロキシおよび/またはアミノ基 1 個または複数の付加的に置換された直鎖または分枝鎖の  $C_1 \sim C_{18}$ -アルキル基、または必要ならば 1 個または複数のヘテロ原子を有し、1 個または複数のハロゲン原子、アルキル基またはアルコキシ基で置換されていてよいアリール基を表す);  $-NR^{30}R^{31}$  基 (ここで同じか異なってよい  $R^{30}$  および  $R^{31}$  は水素原子、必要ならば付加的に 1 個または複数のヒドロキシおよび/またはアミノ基で置換されている直鎖または分枝鎖  $C_1 \sim C_{18}$  アルキル基、置換または非置換で、必要ならば 1 個または複数のヘテロ原子を含むアリール基、アシル基を表すか、窒素原子が、必要ならば 1

- 個または複数のヘテロ原子を含む、炭素原子 3 から 7 個を有するシクロアルキルの一部を形成する)； $-\text{CONR}^{30}\text{R}^{31}$  基 (ここで  $\text{R}^{30}$  および  $\text{R}^{31}$  は前記の意味を有する)；ヒドロキシルアミノ基；ホスフェート基；ホスホネート基；スルフェート基；スルホネート基；スルホンアミド基； $-\text{SO}_2\text{NR}^{30}\text{R}^{31}$  基 (ここで  $\text{R}^{30}$  および  $\text{R}^{31}$  は前記の意味を有する)； $-\text{N}=\text{N}-\text{R}^{32}$  アゾ基 (ここで  $\text{R}^{32}$  は必要ならば 1 個または複数のカルボキシル、ホスホリルまたはスルホネート基で置換された芳香族基あるいはグリコシドが単糖または二糖から選択されている O-グリコシドまたは N-グリコシド基を表す) を表すか； $\text{R}^{20}$  および  $\text{R}^{24}$  ならびに  $\text{R}^{25}$  および  $\text{R}^{29}$  はそれぞれ一緒になって、互いに独立に必要なならば置換された 1 から 4 個の  $\text{CH}_2$  基を有する環を形成し；同じか異なってよい Y および Z は酸素；イオウ；セレン；テルルの原子； $\text{NR}^{33}$  基 (ここで  $\text{R}^{33}$  は水素原子、必要ならば 1 個または複数のカルボキシル、ホスホリルまたはスルホネート基で置換された直鎖または分枝鎖  $\text{C}_1\sim\text{C}_{18}$  アルキル基、必要ならば 1 個または複数のヘテロ原子を含む置換または非置換のアリール基、アラルキル基またはスルホネート基を表す)；あるいは  $-\text{NOR}^{33}$  (ここで  $\text{R}^{33}$  基は前記の意味を有する) を表す] で表される化合物またはそれらの薬理的に許容される塩である請求項 20 記載のニューロン新生促進剤。

34. GSK-3 を阻害する物質が、インジルピン、5-ヨード-インジルピン、5-プロモ-インジルピン、5-クロロ-インジルピン、5-フルオロ-インジルピン、5-メチル-インジルピン、5-ニトロ-インジルピン、5- $\text{SO}_3\text{H}$ -インジルピン、5'-プロモ-インジルピン、5-5'-ジプロモ-インジルピンおよび 5'-プロモ-インジルピン 5-スルホン酸からなる群より選ばれる化合物またはその薬理的に許容される塩である請求項 20 記載のニューロン新生促進剤。

35. GSK-3 を阻害する物質が、インジルピン-3'-モノオキシム、5-ヨード-インジルピン-3'-モノオキシムおよび 5- $\text{SO}_3\text{Na}$ -インジルピン-3'-モノオキシムからなる群より選ばれる化合物またはその薬理的に許容される塩である請求項 20 記載のニューロン新生促進剤。

36. GSK-3 を阻害する物質が、インジルピン-3'-モノオキシムまたはその薬理的に許容される塩である請求項 20 記載のニューロン新生促進剤。

37. 請求項 20～36 のいずれか 1 項に記載のニューロン新生促進剤の存在下、



神経幹細胞を培養して得られるニューロン。

38. 請求項 20～36 のいずれか 1 項に記載のニューロン新生促進剤の存在下、神経幹細胞を培養してニューロンを新生させ、培養物中よりニューロンを採取することを特徴とするニューロンの製造方法。

- 5 39. GSK-3 を阻害する物質を投与することを特徴とする神経再生方法。
40. 神経再生薬の製造のための GSK-3 を阻害する物質の使用。
41. 神経幹細胞のニューロン新生促進剤の製造のための GSK-3 を阻害する物質の使用。

## SEQUENCE LISTING

<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.

<120>

5

<130> 11562W01

<140>

<141>

10

<150> JP2003-114579

<151> 2003-04-18

<160> 17

15

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 420

20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ser Gly Arg Pro Arg Thr Thr Ser Phe Ala Glu Ser Cys Lys Pro

25

1

5

10

15

Val Gln Gln Pro Ser Ala Phe Gly Ser Met Lys Val Ser Arg Asp Lys

20

25

30

Asp Gly Ser Lys Val Thr Thr Val Val Ala Thr Pro Gly Gln Gly Pro

35

40

45

Asp Arg Pro Gln Glu Val Ser Tyr Thr Asp Thr Lys Val Ile Gly Asn

5

50

55

60

Gly Ser Phe Gly Val Val Tyr Gln Ala Lys Leu Cys Asp Ser Gly Glu

65

70

75

80

10 Leu Val Ala Ile Lys Lys Val Leu Gln Asp Lys Arg Phe Lys Asn Arg

85

90

95

Glu Leu Gln Ile Met Arg Lys Leu Asp His Cys Asn Ile Val Arg Leu

100

105

110

15

Arg Tyr Phe Phe Tyr Ser Ser Gly Glu Lys Lys Asp Glu Val Tyr Leu

115

120

125

Asn Leu Val Leu Asp Tyr Val Pro Glu Thr Val Tyr Arg Val Ala Arg

20

130

135

140

His Tyr Ser Arg Ala Lys Gln Thr Leu Pro Val Ile Tyr Val Lys Leu

145

150

155

160

25 Tyr Met Tyr Gln Leu Phe Arg Ser Leu Ala Tyr Ile His Ser Phe Gly

165

170

175

Ile Cys His Arg Asp Ile Lys Pro Gln Asn Leu Leu Leu Asp Pro Asp

180

185

190

Thr Ala Val Leu Lys Leu Cys Asp Phe Gly Ser Ala Lys Gln Leu Val

195

200

205

5 Arg Gly Glu Pro Asn Val Ser Tyr Ile Cys Ser Arg Tyr Tyr Arg Ala

210

215

220

Pro Glu Leu Ile Phe Gly Ala Thr Asp Tyr Thr Ser Ser Ile Asp Val

225

230

235

240

10

Trp Ser Ala Gly Cys Val Leu Ala Glu Leu Leu Leu Gly Gln Pro Ile

245

250

255

Phe Pro Gly Asp Ser Gly Val Asp Gln Leu Val Glu Ile Ile Lys Val

15

260

265

270

Leu Gly Thr Pro Thr Arg Glu Gln Ile Arg Glu Met Asn Pro Asn Tyr

275

280

285

20 Thr Glu Phe Lys Phe Pro Gln Ile Lys Ala His Pro Trp Thr Lys Val

290

295

300

Phe Arg Pro Arg Thr Pro Pro Glu Ala Ile Ala Leu Cys Ser Arg Leu

305

310

315

320

25

Leu Glu Tyr Thr Pro Thr Ala Arg Leu Thr Pro Leu Glu Ala Cys Ala

325

330

335

His Ser Phe Phe Asp Glu Leu Arg Asp Pro Asn Val Lys His Pro Asn

340 345 350

Gly Arg Asp Thr Pro Ala Leu Phe Asn Phe Thr Thr Gln Glu Leu Ser  
355 360 365

5 Ser Asn Pro Pro Leu Ala Thr Ile Leu Ile Pro Pro His Ala Arg Ile  
370 375 380

Gln Ala Ala Ala Ser Thr Pro Thr Asn Ala Thr Ala Ala Ser Asp Ala  
10 385 390 395 400

Asn Thr Gly Asp Arg Gly Gln Thr Asn Asn Ala Ala Ser Ala Ser Ala  
405 410 415

15 Ser Asn Ser Thr  
420

<210> 2  
<211> 1260  
20 <212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 2  
atg tca ggg cgg ccc aga acc acc tcc ttt gcg gag agc tgc aag ccg 48  
25 Met Ser Gly Arg Pro Arg Thr Thr Ser Phe Ala Glu Ser Cys Lys Pro  
1 5 10 15  
gtg gag cag cct tca gct ttt ggc agc atg aaa gtt agc aga gac aag 96  
Val Gln Gln Pro Ser Ala Phe Gly Ser Met Lys Val Ser Arg Asp Lys

	20	25	30	
	gac ggc agc aag gtg aca aca gtg gtg gca act cct ggg cag ggt cca			144
	Asp Gly Ser Lys Val Thr Thr Val Val Ala Thr Pro Gly Gln Gly Pro			
5	35	40	45	
	gac agg cca caa gaa gtc agc tat aca gac act aaa gtg att gga aat			192
	Asp Arg Pro Gln Glu Val Ser Tyr Thr Asp Thr Lys Val Ile Gly Asn			
	50	55	60	
10	gga tca ttt ggt gtg gta tat caa gcc aaa ctt tgt gat tca gga gaa			240
	Gly Ser Phe Gly Val Val Tyr Gln Ala Lys Leu Cys Asp Ser Gly Glu			
	65	70	75	80
15	ctg gtc gcc atc aag aaa gta ttg cag gac aag aga ttt aag aat cga			288
	Leu Val Ala Ile Lys Lys Val Leu Gln Asp Lys Arg Phe Lys Asn Arg			
	85	90	95	
	gag ctc cag atc atg aga aag cta gat cac tgt aac ata gtc cga ttg			336
20	Glu Leu Gln Ile Met Arg Lys Leu Asp His Cys Asn Ile Val Arg Leu			
	100	105	110	
	cgt tat ttc ttc tac tcc agt ggt gag aag aaa gat gag gtc tat ctt			384
	Arg Tyr Phe Phe Tyr Ser Ser Gly Glu Lys Lys Asp Glu Val Tyr Leu			
25	115	120	125	
	aat ctg gtg ctg gac tat gtt ccg gaa aca gta tac aga gtt gcc aga			432
	Asn Leu Val Leu Asp Tyr Val Pro Glu Thr Val Tyr Arg Val Ala Arg			
	130	135	140	

cac tat agt cga gcc aaa cag acg ctc cct gtg att tat gtc aag ttg 480

His Tyr Ser Arg Ala Lys Gln Thr Leu Pro Val Ile Tyr Val Lys Leu

145

150

155

160

5

tat atg tat cag ctg ttc cga agt tta gcc tat atc cat tcc ttt gga 528

Tyr Met Tyr Gln Leu Phe Arg Ser Leu Ala Tyr Ile His Ser Phe Gly

165

170

175

10 atc tgc cat cgg gat att aaa ccg cag aac ctc ttg ttg gat cct gat 576

Ile Cys His Arg Asp Ile Lys Pro Gln Asn Leu Leu Leu Asp Pro Asp

180

185

190

act gct gla tta aaa ctc tgt gac ttt gga agt gca aag cag ctg gtc 624

15 Thr Ala Val Leu Lys Leu Cys Asp Phe Gly Ser Ala Lys Gln Leu Val

195

200

205

cga gga gaa ccc aat gtt tgc tat atc tgt tct cgg tac tat agg gca 672

Arg Gly Glu Pro Asn Val Ser Tyr Ile Cys Ser Arg Tyr Tyr Arg Ala

20

210

215

220

cca gag ttg atc ttt gga gcc act gat tat acc tct agt ata gat gta 720

Pro Glu Leu Ile Phe Gly Ala Thr Asp Tyr Thr Ser Ser Ile Asp Val

225

230

235

240

25

tgg tct gct ggc tgt gtg ttg gct gag ctg tta cta gga caa cca ata 768

Trp Ser Ala Gly Cys Val Leu Ala Glu Leu Leu Leu Gly Gln Pro Ile

245

250

255

ttt cca ggg gat agt ggt gtg gat cag ttg gta gaa ata atc aag gtc 816  
 Phe Pro Gly Asp Ser Gly Val Asp Gln Leu Val Glu Ile Ile Lys Val  
 260 265 270

5 ctg gga act cca aca agg gag caa atc aga gaa atg aac cca aac tac 864  
 Leu Gly Thr Pro Thr Arg Glu Gln Ile Arg Glu Met Asn Pro Asn Tyr  
 275 280 285

aca gaa ttt aaa ttc cct caa att aag gca cat cct tgg act aag gtc 912  
 10 Thr Glu Phe Lys Phe Pro Gln Ile Lys Ala His Pro Trp Thr Lys Val  
 290 295 300

ttc cga ccc cga act cca ccg gag gca att gca ctg tgt agc cgt ctg 960  
 Phe Arg Pro Arg Thr Pro Pro Glu Ala Ile Ala Leu Cys Ser Arg Leu  
 15 305 310 315 320

ctg gag tat aca cca act gcc cga cta aca cca ctg gaa gct tgt gca 1008  
 Leu Glu Tyr Thr Pro Thr Ala Arg Leu Thr Pro Leu Glu Ala Cys Ala  
 325 330 335

20 cat tca ttt ttt gat gaa tta cgg gac cca aat gtc aaa cat cca aat 1056  
 His Ser Phe Phe Asp Glu Leu Arg Asp Pro Asn Val Lys His Pro Asn  
 340 345 350

25 ggg cga gac aca cct gca ctc ttc aac ttc acc act caa gaa ctg tca 1104  
 Gly Arg Asp Thr Pro Ala Leu Phe Asn Phe Thr Thr Gln Glu Leu Ser  
 355 360 365

agt aat cca cct ctg gct acc atc ctt att cct cct cat gct cgg att 1152



Ser Asn Pro Pro Leu Ala Thr Ile Leu Ile Pro Pro His Ala Arg Ile

370

375

380

caa gca gct gct tca acc ccc aca aat gcc aca gca gcg tca gat gct 1200

5 Gln Ala Ala Ala Ser Thr Pro Thr Asn Ala Thr Ala Ala Ser Asp Ala

385

390

395

400

aat act gga gac cgt gga cag acc aat aat gct gct tct gca tca gct 1248

Asn Thr Gly Asp Arg Gly Gln Thr Asn Asn Ala Ala Ser Ala Ser Ala

10

405

410

415

tcc aac tcc acc

1260

Ser Asn Ser Thr

420

15

<210> 3

<211> 737

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20

<400> 3

Met Pro Leu Asn Arg Thr Leu Ser Met Ser Ser Leu Pro Gly Leu Glu

1

5

10

15

25 Asp Trp Glu Asp Glu Phe Asp Leu Glu Asn Ala Val Leu Phe Glu Val

20

25

30

Ala Trp Glu Val Ala Asn Lys Val Gly Gly Ile Tyr Thr Val Leu Gln

35

40

45

Thr Lys Ala Lys Val Thr Gly Asp Glu Trp Gly Asp Asn Tyr Phe Leu

50

55

60

5 Val Gly Pro Tyr Thr Glu Gln Gly Val Arg Thr Gln Val Glu Leu Leu

65

70

75

80

Glu Ala Pro Thr Pro Ala Leu Lys Arg Thr Leu Asp Ser Met Asn Ser

85

90

95

10

Lys Gly Cys Lys Val Tyr Phe Gly Arg Trp Leu Ile Glu Gly Gly Pro

100

105

110

Leu Val Val Leu Leu Asp Val Gly Ala Ser Ala Trp Ala Leu Glu Arg

15

115

120

125

Trp Lys Gly Glu Leu Trp Asp Ile Cys Asn Ile Gly Val Pro Trp Tyr

130

135

140

20

Asp Arg Glu Ala Asn Asp Ala Val Leu Phe Gly Phe Leu Thr Thr Trp

145

150

155

160

Phe Leu Gly Glu Phe Leu Ala Gln Ser Glu Glu Lys Pro His Val Val

165

170

175

25

Ala His Phe His Glu Trp Leu Ala Gly Val Gly Leu Cys Leu Cys Arg

180

185

190

Ala Arg Arg Leu Pro Val Ala Thr Ile Phe Thr Thr His Ala Thr Leu

195                      200                      205

Leu Gly Arg Tyr Leu Cys Ala Gly Ala Val Asp Phe Tyr Asn Asn Leu

210                      215                      220

5                      Glu Asn Phe Asn Val Asp Lys Glu Ala Gly Glu Arg Gln Ile Tyr His

225                      230                      235                      240

Arg Tyr Cys Met Glu Arg Ala Ala Ala His Cys Ala His Val Phe Thr

10                      245                      250                      255

Thr Val Ser Gln Ile Thr Ala Ile Glu Ala Gln His Leu Leu Lys Arg

260                      265                      270

15                      Lys Pro Asp Ile Val Thr Pro Asn Gly Leu Asn Val Lys Lys Phe Ser

275                      280                      285

Ala Met His Glu Phe Gln Asn Leu His Ala Gln Ser Lys Ala Arg Ile

20                      290                      295                      300

Gln Glu Phe Val Arg Gly His Phe Tyr Gly His Leu Asp Phe Asn Leu

305                      310                      315                      320

Asp Lys Thr Leu Tyr Phe Phe Ile Ala Gly Arg Tyr Glu Phe Ser Asn

25                      325                      330                      335

Lys Gly Ala Asp Val Phe Leu Glu Ala Leu Ala Arg Leu Asn Tyr Leu

340                      345                      350

Leu Arg Val Asn Gly Ser Glu Gln Thr Val Val Ala Phe Phe Ile Met

355

360

365

Pro Ala Arg Thr Asn Asn Phe Asn Val Glu Thr Leu Lys Gly Gln Ala

5

370

375

380

Val Arg Lys Gln Leu Trp Asp Thr Ala Asn Thr Val Lys Glu Lys Phe

385

390

395

400

10 Gly Arg Lys Leu Tyr Glu Ser Leu Leu Val Gly Ser Leu Pro Asp Met

405

410

415

Asn Lys Met Leu Asp Lys Glu Asp Phe Thr Met Met Lys Arg Ala Ile

420

425

430

15

Phe Ala Thr Gln Arg Gln Ser Phe Pro Pro Val Cys Thr His Asn Met

435

440

445

Leu Asp Asp Ser Ser Asp Pro Ile Leu Thr Thr Ile Arg Arg Ile Gly

20

450

455

460

Leu Phe Asn Ser Ser Ala Asp Arg Val Lys Val Ile Phe His Pro Glu

465

470

475

480

25 Phe Leu Ser Ser Thr Ser Pro Leu Leu Pro Val Asp Tyr Glu Glu Phe

485

490

495

Val Arg Gly Cys His Leu Gly Val Phe Pro Ser Tyr Tyr Glu Pro Trp

500

505

510

Gly Tyr Thr Pro Ala Glu Cys Thr Val Met Gly Ile Pro Ser Ile Ser  
515 520 525

5 Thr Asn Leu Ser Gly Phe Gly Cys Phe Met Glu Glu His Ile Ala Asp  
530 535 540

Pro Ser Ala Tyr Gly Ile Tyr Ile Leu Asp Arg Arg Phe Arg Ser Leu  
545 550 555 560

10

Asp Asp Ser Cys Ser Gln Leu Thr Ser Phe Leu Tyr Ser Phe Cys Gln  
565 570 575

Gln Ser Arg Arg Gln Arg Ile Ile Gln Arg Asn Arg Thr Glu Arg Leu  
15 580 585 590

Ser Asp Leu Leu Asp Trp Lys Tyr Leu Gly Arg Tyr Tyr Met Ser Ala  
595 600 605

20 Arg His Met Ala Leu Ser Lys Ala Phe Pro Glu His Phe Thr Tyr Glu  
610 615 620

Pro Asn Glu Ala Asp Ala Ala Gln Gly Tyr Arg Tyr Pro Arg Pro Ala  
625 630 635 640

25

Ser Val Pro Pro Ser Pro Ser Leu Ser Arg His Ser Ser Pro His Gln  
645 650 655

Ser Glu Asp Glu Glu Asp Pro Arg Asn Gly Pro Leu Glu Glu Asp Gly

660

665

670

Glu Arg Tyr Asp Glu Asp Glu Glu Ala Ala Lys Asp Arg Arg Asn Ile

675

680

685

5

Arg Ala Pro Glu Trp Pro Arg Arg Ala Ser Cys Thr Ser Ser Thr Ser

690

695

700

Gly Arg Lys Arg Asn Ser Val Asp Thr Ala Thr Ser Ser Ser Leu Ser

10 705

710

715

720

Thr Pro Ser Glu Pro Leu Ser Pro Thr Ser Ser Leu Gly Glu Glu Arg

725

730

735

15 Asn

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 2211

&lt;212&gt; DNA

20 &lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 4

atg cct tta aac cgc act ttg tcc atg tcc tca ctg cca gga ctg gag 48

Met Pro Leu Asn Arg Thr Leu Ser Met Ser Ser Leu Pro Gly Leu Glu

25

1

5

10

15

gac tgg gag gat gaa ttc gac ctg gag aac gca gtg ctc ttc gaa gtg 96

Asp Trp Glu Asp Glu Phe Asp Leu Glu Asn Ala Val Leu Phe Glu Val

20

25

30

gcc tgg gag gtg gct aac aag gtg ggt ggc atc tac acg gtg ctg cag 144  
 Ala Trp Glu Val Ala Asn Lys Val Gly Gly Ile Tyr Thr Val Leu Gln  
 35 40 45

5  
 acg aag gcg aag gtg aca ggg gac gaa tgg ggc gac aac tac ttc ctg 192  
 Thr Lys Ala Lys Val Thr Gly Asp Glu Trp Gly Asp Asn Tyr Phe Leu  
 50 55 60

10  
 gtg ggg ccg tac acg gag cag ggc gtc agg acc cag gtg gaa ctg ctg 240  
 Val Gly Pro Tyr Thr Glu Gln Gly Val Arg Thr Gln Val Glu Leu Leu  
 65 70 75 80

15  
 gag gcc ccc acc ccg gcc ctg aag agg aca ctg gat tcc atg aac agc 288  
 Glu Ala Pro Thr Pro Ala Leu Lys Arg Thr Leu Asp Ser Met Asn Ser  
 85 90 95

20  
 aag ggc tgc aag gtg tat ttc ggg cgc tgg ctg atc gag gga ggc cct 336  
 Lys Gly Cys Lys Val Tyr Phe Gly Arg Trp Leu Ile Glu Gly Gly Pro  
 100 105 110

25  
 ctg gtg gtg ctc ctg gac gtg ggt gcc tca gct tgg gcc ctg gag cgc 384  
 Leu Val Val Leu Leu Asp Val Gly Ala Ser Ala Trp Ala Leu Glu Arg  
 115 120 125

tgg aag gga gag ctc tgg gat atc tgc aac atc gga gtg ccg tgg tac 432  
 Trp Lys Gly Glu Leu Trp Asp Ile Cys Asn Ile Gly Val Pro Trp Tyr  
 130 135 140

gac cgc gag gcc aac gac gct gtc ctc ttt ggc ttt ctg acc acc tgg 480  
 Asp Arg Glu Ala Asn Asp Ala Val Leu Phe Gly Phe Leu Thr Thr Trp  
 145 150 155 160

5 ttc ctg ggt gag ttc ctg gca cag agt gag gag aag cca cat gtg gtt 528  
 Phe Leu Gly Glu Phe Leu Ala Gln Ser Glu Glu Lys Pro His Val Val  
 165 170 175

gct cac ttc cat gag tgg ttg gca ggc gtt gga ctc tgc ctg tgt cgt 576  
 10 Ala His Phe His Glu Trp Leu Ala Gly Val Gly Leu Cys Leu Cys Arg  
 180 185 190

gcc cgg cga ctg cct gta gca acc atc ttc acc acc cat gcc acg ctg 624  
 15 Ala Arg Arg Leu Pro Val Ala Thr Ile Phe Thr Thr His Ala Thr Leu  
 195 200 205

ctg ggg cgc tac ctg tgt gcc ggt gcc gtg gac ttc tac aac aac ctg 672  
 Leu Gly Arg Tyr Leu Cys Ala Gly Ala Val Asp Phe Tyr Asn Asn Leu  
 210 215 220

20 gag aac ttc aac gtg gac aag gaa gca ggg gag agg cag atc tac cac 720  
 Glu Asn Phe Asn Val Asp Lys Glu Ala Gly Glu Arg Gln Ile Tyr His  
 225 230 235 240

25 cga tac tgc atg gaa agg gcg gca gcc cac tgc gct cac gtc ttc act 768  
 Arg Tyr Cys Met Glu Arg Ala Ala Ala His Cys Ala His Val Phe Thr  
 245 250 255

act gtg tcc cag atc acc gcc atc gag gca cag cac ttg ctc aag agg 816



Thr Val Ser Gln Ile Thr Ala Ile Glu Ala Gln His Leu Leu Lys Arg  
 260 265 270  
 aaa cca gat att gtg acc ccc aat ggg ctg aat gtg aag aag ttt tct 864  
 5 Lys Pro Asp Ile Val Thr Pro Asn Gly Leu Asn Val Lys Lys Phe Ser  
 275 280 285  
 gcc atg cat gag ttc cag aac ctc cat gct cag agc aag gct cga atc 912  
 Ala Met His Glu Phe Gln Asn Leu His Ala Gln Ser Lys Ala Arg Ile  
 10 290 295 300  
 cag gag ttt gtg cgg ggc cat ttt tat ggg cat ctg gac ttc aac ttg 960  
 Gln Glu Phe Val Arg Gly His Phe Tyr Gly His Leu Asp Phe Asn Leu  
 305 310 315 320  
 15 gac aag acc tta tac ttc ttt atc gcc ggc cgc tat gag ttc tcc aac 1008  
 Asp Lys Thr Leu Tyr Phe Phe Ile Ala Gly Arg Tyr Glu Phe Ser Asn  
 325 330 335  
 20 aag ggt gct gac gtc ttt ctg gag gca ttg gct cgg ctc aac tat ctg 1056  
 Lys Gly Ala Asp Val Phe Leu Glu Ala Leu Ala Arg Leu Asn Tyr Leu  
 340 345 350  
 ctc aga gtg aac ggc agc gag cag aca gtg gtt gcc ttc ttc atc atg 1104  
 25 Leu Arg Val Asn Gly Ser Glu Gln Thr Val Val Ala Phe Phe Ile Met  
 355 360 365  
 cca gcg cgg acc aac aat ttc aac gtg gaa acc ctc aaa ggc caa gct 1152  
 Pro Ala Arg Thr Asn Asn Phe Asn Val Glu Thr Leu Lys Gly Gln Ala

	370	375	380	
	gtg cgc aaa cag ctt tgg gac acg gcc aac acg gtg aag gaa aag ttc 1200			
	Val Arg Lys Gln Leu Trp Asp Thr Ala Asn Thr Val Lys Glu Lys Phe			
5	385	390	395	400
	ggg agg aag ctt tat gaa tcc tta ctg gtt ggg agc ctt ccc gac atg 1248			
	Gly Arg Lys Leu Tyr Glu Ser Leu Leu Val Gly Ser Leu Pro Asp Met			
	405	410	415	
10	aac aag atg ctg gat aag gaa gac ttc act atg atg aag aga gcc atc 1296			
	Asn Lys Met Leu Asp Lys Glu Asp Phe Thr Met Met Lys Arg Ala Ile			
	420	425	430	
15	ttt gca acg cag cgg cag tct ttc ccc cct gtg tgc acc cac aat atg 1344			
	Phe Ala Thr Gln Arg Gln Ser Phe Pro Pro Val Cys Thr His Asn Met			
	435	440	445	
	ctg gat gac tcc tca gac ccc atc ctg acc acc atc cgc cga atc ggc 1392			
20	Leu Asp Asp Ser Ser Asp Pro Ile Leu Thr Thr Ile Arg Arg Ile Gly			
	450	455	460	
	ctc ttc aat agc agt gcc gac agg gtg aag gtg att ttc cac ccg gag 1440			
	Leu Phe Asn Ser Ser Ala Asp Arg Val Lys Val Ile Phe His Pro Glu			
25	465	470	475	480
	ttc ctc tcc tcc aca agc ccc ctg ctc cct gtg gac tat gag gag ttt 1488			
	Phe Leu Ser Ser Thr Ser Pro Leu Leu Pro Val Asp Tyr Glu Glu Phe			
	485	490	495	

gtc cgt ggc tgt cac ctt gga gtc ttc ccc tcc tac tat gag cct tgg 1536  
 Val Arg Gly Cys His Leu Gly Val Phe Pro Ser Tyr Tyr Glu Pro Trp  
 500 505 510

5 ggc tac aca ccg gct gag tgc acg gtt atg gga atc ccc agt atc tcc 1584  
 Gly Tyr Thr Pro Ala Glu Cys Thr Val Met Gly Ile Pro Ser Ile Ser  
 515 520 525

10 acc aat ctc tcc ggc ttc ggc tgc ttc atg gag gaa cac atc gca gac 1632  
 Thr Asn Leu Ser Gly Phe Gly Cys Phe Met Glu Glu His Ile Ala Asp  
 530 535 540

ccc tca gct tac ggt atc tac att ctt gac cgg cgg ttc cgc agc ctg 1680  
 15 Pro Ser Ala Tyr Gly Ile Tyr Ile Leu Asp Arg Arg Phe Arg Ser Leu  
 545 550 555 560

gat gat tcc tgc tcg cag ctc acc tcc ttc ctc tac agt ttc tgt cag 1728  
 Asp Asp Ser Cys Ser Gln Leu Thr Ser Phe Leu Tyr Ser Phe Cys Gln  
 20 565 570 575

cag agc cgg cgg cag cgt atc atc cag cgg aac cgc acg gag cgc ctc 1776  
 Gln Ser Arg Arg Gln Arg Ile Ile Gln Arg Asn Arg Thr Glu Arg Leu  
 580 585 590

25 tcc gac ctt ctg gac tgg aaa tac cta ggc cgg tac tat atg tct gcg 1824  
 Ser Asp Leu Leu Asp Trp Lys Tyr Leu Gly Arg Tyr Tyr Met Ser Ala  
 595 600 605

cgc cac atg gcg ctg tcc aag gcc ttt cca gag cac ttc acc tac gag 1872  
 Arg His Met Ala Leu Ser Lys Ala Phe Pro Glu His Phe Thr Tyr Glu  
 610 615 620

5 ccc aac gag gcg gat gcg gcc cag ggg tac cgc tac cca cgg cca gcc 1920  
 Pro Asn Glu Ala Asp Ala Ala Gln Gly Tyr Arg Tyr Pro Arg Pro Ala  
 625 630 635 640

10 tcg gtg cca ccg tgc ccc tgc ctg tca cga cac tcc agc ccg cac cag 1968  
 Ser Val Pro Pro Ser Pro Ser Leu Ser Arg His Ser Ser Pro His Gln  
 645 650 655

15 agt gag gac gag gag gat ccc cgg aac ggg ccg ctg gag gaa gac ggc 2016  
 Ser Glu Asp Glu Glu Asp Pro Arg Asn Gly Pro Leu Glu Glu Asp Gly  
 660 665 670

20 gag cgc tac gat gag gac gag gag gcc gcc aag gac cgg cgc aac atc 2064  
 Glu Arg Tyr Asp Glu Asp Glu Glu Ala Ala Lys Asp Arg Arg Asn Ile  
 675 680 685

cgt gca cca gag tgg ccg cgc cga gcg tcc tgc acc tcc tcc acc agc 2112  
 Arg Ala Pro Glu Trp Pro Arg Arg Ala Ser Cys Thr Ser Ser Thr Ser  
 690 695 700

25 ggc cgc aag cgc aac tct gtg gac acg gcc acc tcc agc tca ctc agc 2160  
 Gly Arg Lys Arg Asn Ser Val Asp Thr Ala Thr Ser Ser Ser Leu Ser  
 705 710 715 720

acc ccg agc gag ccc ctc agc ccc acc agc tcc ctg ggc gag gag cgt 2208

Thr Pro Ser Glu Pro Leu Ser Pro Thr Ser Ser Leu Gly Glu Glu Arg

725

730

735

aac

2211

5 Asn

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 60

&lt;212&gt; PRT

10 &lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic PRT

&lt;400&gt; 5

15 Tyr Arg Arg Ala Ala Val Pro Pro Ser Pro Ser Leu Ser Arg His Ser

1

5

10

15

Ser Pro His Gln Ser Glu Asp Glu Glu Glu

20

25

20

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

25

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

&lt;400&gt; 6

agggtatgat aaccgggaga tcgt

24

<210> 7

<211> 24

<212> DNA

5 <213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 7

10 gggccatata gttccacaaa ggca

24

<210> 8

<211> 24

<212> DNA

15 <213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 8

20 caaaaggcac tggaactcgc aatg

24

<210> 9

<211> 24

<212> DNA

25 <213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 9

ttcttggcaa cggcaacaaa ccac

24

<210> 10

<211> 24

5 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

10 <400> 10

ggatgaatcga gaagagccat catg

24

<210> 11

<211> 24

15 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

20 <400> 11

ttcaggtaga gttggaggct gatg

24

<210> 12

<211> 25

25 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 12

gaagaacttt cctgatggcc accag

25

<210> 13

5 <211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

10

<400> 13

ctggtagcca tcaggaaagt tcttc

25

<210> 14

15 <211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic RNA

20

<400> 14

gucaguuaca cagacacuat t

21

<210> 15

25 <211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic RNA



<400> 15

uagugucugu gaaacugact t

21

5 <210> 16

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

10 <223> Description of Artificial Sequence: synthetic RNA

<400> 16

gucuagccua uauccauuct t

21

15 <210> 17

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

20 <223> Description of Artificial Sequence: synthetic RNA

<400> 17

gaauggauau aggcuaagact t

21

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/005503

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> A61K45/00, 31/404, 31/4045, 31/405, 31/407, 31/553, C07D403/04,  
403/14, 498/22, A61P25/28, 25/08, 25/22, 25/18, 25/24, C07D487/14

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> A61K45/00, 31/404, 31/4045, 31/405, 31/407, 31/553, C07D403/04,  
403/14, 498/22, A61P25/28, 25/08, 25/22, 25/18, 25/24, C07D487/14

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2004  
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2004 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2004

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN), BIOSIS (STN), REGISTRY (STN), EMBASE (STN), MEDLINE (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 02/062387 A1 (SMITHKLINE BEECHAM P.L.C.), 15 August, 2002 (15.08.02), Full text; particularly, Claims 1 to 12 (Family: none)	1-3, 20, 37, 38, 40, 41 4-19, 21-36
X	WO 99/42100 A1 (Sagami Chemical Research Center), 26 August, 1999 (26.08.99), Full text; particularly, Claims 1 to 19; compound No.13 & EP 1057484 A1	1-3, 5-7, 20, 22-24, 37, 38, 40, 41
X	JP 2-306974 A (Goedecke AG.), 20 December, 1990 (20.12.90), Full text; particularly, Claims 1 to 7 & EP 397060 A3	1-3, 5-7, 20, 22-24, 37, 38, 40, 41



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
09 June, 2004 (09.06.04)

Date of mailing of the international search report  
29 June, 2004 (29.06.04)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/005503

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01/13916 A1 (Sagami Chemical Research Center), 01 March, 2001 (01.03.01), Full text; particularly, Claims 1 to 17; compound Nos. 15, 16 & EP 1224932 A1	1-3, 5, 6, 8, 10, 20, 22, 23, 25, 27, 37, 38, 40, 41
X	JP 7-508268 A (Goedecke AG.), 14 September, 1995 (14.09.95), Full text; particularly, Claims 1 to 15 & US 5883114 A	1-3, 5, 6, 20, 22, 23, 37, 38, 40, 41
X	WO 00/38675 A1 (SMITHKLINE BEECHM P.L.C.), 06 July, 2000 (06.07.00), Full text; particularly, Claims 1 to 11; examples & EP 1140070 A1	1-3, 5, 9, 10, 20, 22, 26, 27, 37, 38, 40, 41
X	LOAST, Maryse et al., Paullones are potent inhibitors of glycogen synthase kinase-3 $\beta$ and cyclin-dependent kinase 5/p25, Eur. J. Biochem., 2000, Vol.267, pages 5983 to 5994; full text, particularly, page 5983; Fig. 2	1-3, 5, 11-15, 20, 22, 28-32, 37, 38, 40, 41
X	WO 01/37819 A2 (CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE), 31 May, 2001 (31.05.01), Full text; particularly, Claims 1 to 15 & JP 2003-514850 A	1-3, 16-20, 33-38, 40, 41
X	CHEN, Guang et al., Enhancement of hippocampal neurogenesis by lithium, Journal of Neuro chemistry, 2000, Vol.75, pages 1729 to 1734;	1-4, 20, 21, 37, 38, 40, 41
Y	full text; particularly, page 1729, abstract	5-19, 22-36

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/005503

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

a. type of material



a sequence listing



table(s) related to the sequence listing

b. format of material



in written format



in computer readable form

c. time of filing/furnishing



contained in the international application as filed



filed together with the international application in computer readable form



furnished subsequently to this Authority for the purposes of search

2. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/005503

## Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 39  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Claim 39 pertains to methods for treatment of the human body by therapy.
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:  
(See extra sheet.)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/005503

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

It appears that the matter common to nerve degeneration drugs containing as the active ingredient the compounds having specific structures represented by the formulae (I) to (V) as set forth in claims 1 to 41 resides in "a nerve degeneration drug containing as the active ingredient a substance inhibiting the activity of a glycogen synthase kinase-3".

On the other hand, a nerve degeneration drug containing a substance inhibiting the activity of a glycogen synthase kinase-3 as the active ingredient is reported in the following document. Thus, the constitution of the above common matter cannot be considered as being novel and, therefore, cannot be regarded as the gist of the invention.

Such being the case, the nerve degeneration drugs containing as the active ingredient the compounds represented by the five different formulae as set forth in claims 1 to 41 cannot be regarded as a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

Document: WO 02/062387 A1 (SMKTHKLINE BEECHAM P.L.C.) 2002.08.15

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>1</sup> A61K45/00, 31/404, 31/4045, 31/405, 31/407, 31/553, C07D403/04, 403/14, 498/22, A61P25/28, 25/08, 25/22, 25/18, 25/24, C07D487/14

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>1</sup> A61K45/00, 31/404, 31/4045, 31/405, 31/407, 31/553, C07D403/04, 403/14, 498/22, A61P25/28, 25/08, 25/22, 25/18, 25/24, C07D487/14

## 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1922-1996年

日本国公開実用新案公報 1971-2004年

日本国登録実用新案公報 1994-2004年

日本国実用新案登録公報 1996-2004年

## 国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN) BIOSIS (STN)

REGISTRY (STN) EMBASE (STN)

MEDLINE (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO 02/062387 A1 (SMITHKLINE BEECHAM P. L. C.) 2002. 08. 15, 全文, 特に請求項1-12 (ファミリーなし)	1-3, 20, 37, 38, 40, 41
Y		4-19, 21-36
X	WO 99/42100 A1 (財団法人相模中央化学研究所) 1999. 08. 26, 全文, 特に請求項1-19, 化合物13等 & EP 1057484 A1	1-3, 5-7, 20, 22-24, 37, 38 40, 41

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に関する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

09. 06. 2004

国際調査報告の発送日 29. 6. 2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

小堀 麻子

4C

2938

電話番号 03-3581-1101 内線 3451

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP 2-306974 A(ゲデッケ・アクチエングゼルシャフト)1990. 12. 20, 全文, 特に請求項1-7 & EP 397060 A3	1-3, 5-7, 20, 22-24, 37, 38, 40, 41
X	WO 01/13916 A1(財団法人相模中央化学研究所)2001. 03. 01, 全文, 特に請求項1-17, 化合物15, 16 & EP 1224932 A1	1-3, 5, 6, 8, 10 20, 22, 23, 25, 27, 37, 38, 40, 41
X	JP 7-508268 A(ゲデッケ・アクチエングゼルシャフト)1995. 09. 14 全文, 特に請求項1-15 & US 5883114 A	1-3, 5, 6, 20, 22, 23, 37, 38, 40, 41
X	WO 00/38675 A1(SMITHKLINE BEECHM P.L.C)2000. 07. 06, 全文, 特 に請求項1-11, EXAMPLE & EP 1140070 A1	1-3, 5, 9, 10, 20, 22, 26, 27, 37, 38, 40, 41
X	LOAST, Maryse <i>et al</i> , Paullones are potent inhibitors of glycogen synthase kinase-3 $\beta$ and cyclin-dependent kinase 5/p25, Eur. J. Biochem., 2000, Vol.267, pp5983-5994, 全文, 特に第5983頁, Fig.2	1-3, 5, 11-15, 20, 22, 28-32, 37, 38, 40, 41
X	WO 01/37819 A2(CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE)2001. 05. 31, 全文, 特に請求項1-15 & JP 2003-514850 A	1-3, 16-20, 33-38, 40, 41
X	CHEN, Guang <i>et al</i> , Enhancement of hippocampal neurogenesis by lithium, Journal of Neurochemistry, 2000, Vol.75, pp1729- 1734, 全文, 特に第1729頁Abstract	1-4, 20, 21, 37, 38, 40, 41
Y		5-19, 22-36



## 第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列 (第 1 ページの 1. b の続き)

1. この国際出願で開示されかつ請求の範囲に係る発明に必要なヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下に基づき国際調査を行った。

a. タイプ ☒ 配列表

☐ 配列表に関連するテーブル

b. フォーマット ☒ 書面

☐ コンピュータ読み取り可能な形式

c. 提出時期 ☐ 出願時の国際出願に含まれる

☒ この国際出願と共にコンピュータ読み取り可能な形式により提出された

☐ 出願後に、調査のために、この国際調査機関に提出された

2. ☒ さらに、配列表又は配列表に関連するテーブルを提出した場合に、出願後に提出した配列若しくは追加して提出した配列が出願時に提出した配列と同一である旨、又は、出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見：

## 第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 39 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、  
請求の範囲39は治療による人体の処置方法に関するものである。
2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところこの国際調査機関は認めた。

特別ページ参照

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

(第Ⅲ欄の続き)

本願の請求の範囲1-41に係る、式(I)-(V)で表される特定の構造を有する化合物を有効成分とする神経再生薬の共通部は「グリコーゲンシンターゼキナーゼ-3の活性を阻害する物質を有効成分として含有してなる神経再生薬」であると認められる。

一方、下記文献には、グリコーゲンシンターゼキナーゼ-3の活性を阻害する物質を有効成分として含有する神経再生薬が記載されているため、上記共通部の構成は新規な事項であると認められず、発明の主要部とみることができない。

してみれば、本願の請求の範囲1-41に係る、5つの異なる式で表される化合物を有効成分とする神経再生薬の発明は、互いに単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明には該当しない。

文献：WO 02/062387 A1 (SMITHKLINE BEECHAM P. L. C.) 2002. 08. 15